

Sikkerhetsfarmakologi og nevronal utvikling: PC12-celler og kyllingkornceller som modeller.

Rose-Marie Stange Bekkevold



Masteroppgave i farmasi

Farmasøytisk institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

April 2011

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble påbegynt juni 2010 og avsluttet april 2011.

Først og fremst vil jeg rette et stort takk til mine veiledere Ragnhild E. Paulsen og Gro H. Mathisen. Dere har begge bidratt med dyktig og målrettet veiledning gjennom dette året. Ragnhild, takk for din solide og imponerende kunnskap, og for alle gode råd du har gitt meg. Gro, takk for din oppmuntring og for at du alltid har tatt deg tid.

Takk til Mona Gaarder for god opplæring på laben, og Bjørn Oddvar Strøm for at du alltid svarte på spørsmålene mine og for all hjelp du har gitt meg.

Takk til min kjære Jon Atle for at du er så tålmodig og snill, og sånn en god venn. Og fordi du har humor, og lager gode middager til meg.

Takk til mamma og pappa – aldri har noen fått en mer hengiven og uforbeholden støtte enn den jeg har fått av dere.

Takk til mine storesøstre, Lise-Lotte og Silje Veslemøy, for at dere har oppmuntret meg gjennom dette året. Jeg gleder meg veldig til å bli tante!

Til slutt vil jeg takke alle som har gjort dette hovedfagsåret til et spennende og lærerikt år!

Oslo, april 2011

Rose-Marie Stange Bekkevold

Sammendrag

Under utvikling av sentralnervesystemet gir celleproliferasjon opphav til et stort antall celler. Forløperceller differensierer til nevroner, celler migrerer til deres endelige destinasjon og nevruttvekst gir strukturell plastisitet. Celler som ikke danner riktige forbindelser elimineres ved apoptose. Legemidler gitt under svangerskapet eller postnatalt kan virke forstyrrende på disse prosessene, og føre til permanente endringer av hjernens struktur og funksjon. Dekametason (Dex) er et legemiddel som administreres til gravide kvinner med fare for prematur fødsel. Oppfølgingsstudier har vist at Dex kan gi kognitive og motoriske forstyrrelser, funksjoner som er tilegnet lillehjernen. PC12-celler og primære nevronkulturer har tidligere blitt foreslått som "screening"-modeller, for å studere effekter av kjemikalier på nevronal utvikling. I denne studien har PC12-celler og kornceller fra lillehjerne hos kylling blitt evaluert som modeller, for å studere effekter av legemidler på nevronal utvikling.

PC12-celler ble behandlet med Dex, og effekter på nevruttvekst studert i et mikroskop. Fire ulike endepunkter for nevruttvekst ble studert, for å kartlegge metodens robusthet. Caspaser forbindes ofte med apoptose, men flere studier har vist at caspaser også kan ha ikke-apoptotiske funksjoner. En caspase-3-hemmer ble benyttet for å undersøke om caspase-3 er viktig for mekanismene bak nevruttvekst. Kornceller fra lillehjerne hos kylling ble isolert tre til fire dager før eggene klekkes naturlig, for å studere korncellene *in vitro* mens de fortsatt er under utvikling. Korncellekulturer ble høstet til westernblotting, og PCNA, NeuN og Pax 6 ble brukt som markører for celler som prolifererer, differensierer og migrerer. Videre ble effekter av Ara-C på nevronal utvikling studert. Ara-C er en cellegift som ofte benyttes i korncellekulturer, men det er uvisst hvorvidt Ara-C selv påvirker utviklingen av nevroner *in vitro*.

I PC12-celler ble det vist at Dex gav økte nevrittelengder. Studien demonstrerer at nevrittelengder er et robust endepunkt for å studere effekter på nevronal utvikling i PC12-celler. Videre ble det vist at caspase-3 er viktig for nevruttvekst induert av veksthormonet NGF, men ikke av Dex. En forsinket nevruttvekst ble observert da caspase-3 ble hemmet. Ara-C påvirket uttrykket av PCNA, NeuN og Pax 6 i korncellekulturer. Dette kan være av betydning ved bruk av kornceller fra lillehjerne som modell innen sikkerhetsfarmakologiske studier.

Forkortelser

Ad	Opp til
ANOVA	Analysis of Variance
Ara-C	Cytosine β -D-arabino-furanoside
APS	Ammonium persulfat
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovint serumalbumin
CAM	Celleadhesjons-molekyl
Caspase (DEVD)2-R110	Cystein-aspartat-spesifikk-protease (aspartat-glutamat-valin-aspartat)2-rodamin 110
Dex	Deksametason
DIV	Dag <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase1	Deoksyribonuklease
EGTA	Etylenglykoltetraeddiksyre
EtOH	Etanol
FBS	Føtalt kalveserum
GRE	Glukokortikoid-responselement
GR	Glukokortikoidreseptor
HRP	Pepperrot peroksidase
MAP	Mikrotubulus-assosiert protein
MR	Mineralkortikoidreseptor
MRE	Mineralkortikoid-responselement
MQ	Milli Q
NCAM	Nevronal celleadhesjons-molekyl
NeuN	Neuronal Nuclei
NGF	Nervevekstfaktor
NMDA	N-metyl-D-aspartat
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PMSF	Pentametansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsyre

R ²	Multippel korrelasjonskoeffisient
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SE	Standardfeil
SiRNA	Små interferende RNA
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TG	Tris-Glycinbuffer
TGS	Tris Glycin-SDS-buffer
Tris	Trishydroksymetylaminometan
Tween	Polyoksyetylen sorbitan monolaurat
Ubh	Ubehandlet
Z-DEVD-cmk	Z-aspartat-glutamat-valin-aspartat-klormetylketon

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	10
1.1 HJERNEN UNDER UTVIKLING	10
1.1.1 Celleproliferasjon og differensiering	10
1.1.2 Nevritutvekst	11
1.1.3 Effekter av nervevekstfaktor i sentralnervesystemet under utvikling	13
1.1.4 Nervevekstfaktorreseptorer	13
1.1.5 Caspaser og ikke-apoptotiske effekter	14
1.2 LILLEHJERNEN UNDER UTVIKLING	15
1.2.1 Lillehjernebarken	15
1.2.2 Migrering av kornceller i lillehjernebarken	16
1.3 EFFEKTER AV NMDA-RESEPTOREN I LILLEHJERNEN UNDER UTVIKLING	18
1.4 EFFEKTER AV GLUKOKORTIKOIDER I SENTRALNERVESYSTEMET UNDER UTVIKLING	20
1.4.1 Glukokortikoidreseptoren	21
1.4.2 Mineralkortikoidreseptoren	22
1.4.3 Deksametason	22
1.4.4 Effekter av deksametason i sentralnervesystemet under utvikling	23
1.5 SIKKERHETSFARMAKOLOGI	24
1.5.1 PC12-celler som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi	24
1.5.2 Kornceller fra lillehjerne hos kylling som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi	25
1.6 MÅL MED OPPGAVEN	26
2. MATERIALER OG METODER	27
2.1 OVERSIKT OVER KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER	27

2.2	KORNCELLEKULTURER FRA LILLEHJERNE HOS KYLLING	29
2.2.1	<i>Korncellekulturer</i>	29
2.2.2	<i>Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler</i>	29
2.2.3	<i>Preparering av korncellekulturer</i>	30
	<i>Prosedyre for preparering av korncellekulturer</i>	31
2.2.4	<i>Tilsetting av ernæringsmedium med Ara-C til korncellekulturer</i>	34
2.3	PC12-CELLER	35
2.3.1	<i>Splitting av PC12-celler til flaske</i>	36
2.3.2	<i>Splitting av PC12-celler til skåler</i>	36
2.3.3	<i>Eksposering av PC12-celler</i>	37
2.4	MORFOMETRISK ANALYSE I MIKROSKOP	40
2.5	DETEKSJON AV CELLEDØD I PC12-CELLER	43
	<i>Prosedyre for farging med trypanblå</i>	43
2.6	WESTERNBLOTTING	44
2.6.1	<i>Westernblotting av proteiner fra PC12-celler</i>	45
2.6.2	<i>Westernblotting av proteiner fra korncellekulturer</i>	45
2.6.3	<i>Høsting av celler til westernblotting</i>	45
2.6.4	<i>Proteinmåling</i>	46
	<i>Prosedyre for måling av relativ proteinmengde</i>	46
2.6.5	<i>Proteinjustering av prøver</i>	48
2.6.6	<i>Støping av gel</i>	49
2.6.7	<i>Gelelektroforese</i>	51
2.6.8	<i>Blotting av gel</i>	52
2.6.9	<i>Ponceaus farging og blokking av membran</i>	53

2.6.10	<i>Tilsetting av primære og sekundære antistoff</i>	54
2.6.11	<i>Fremkalling</i>	56
2.6.12	<i>Stripping av membran</i>	57
2.6.13	<i>Måling av westernbåndstyrke</i>	57
2.7	CASPASE-ASSAY	58
2.7.1	<i>Høsting av celler til caspase-assay</i>	59
2.7.2	<i>Måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler</i>	60
2.8	GRAFER OG STATISTIKK	62
3.	RESULTATER	63
3.1	NEVRITTUTVEKST I PC12-CELLER	63
3.1.1	<i>Effekter av Dex og NGF på nevrittutvekst og celledød i PC12-celler</i>	64
3.1.2	<i>Effekter av Ara-C på nevrittutvekst og celledød i PC12-celler</i>	68
3.1.3	<i>Effekter av mifepriston og RU28318 på nevrittutvekst i PC12-celler eksponert for Dex og NGF</i>	72
3.2	EFFEKTER AV CASPASE-3 I PC12-CELLER	76
3.2.1	<i>Caspase-3-aktivitet i PC12-celler eksponert for Dex og NGF</i>	76
3.2.2	<i>Effekter av caspase-3-hemmer på nevrittutvekst induert av Dex og NGF i PC12-celler</i>	77
3.2.3	<i>Map 2 som differensieringsmarkør i PC12-celler</i>	84
3.3	CELLEPROLIFERASJON I PC12-CELLER	86
3.3.1	<i>Effekter av Dex, NGF og Ara-C på celleproliferasjon i PC12-celler</i>	87
3.3.2	<i>Effekter av mifepriston og RU28318 på celleproliferasjon i Dex-, NGF- og Ara-C-eksponerte PC12-celler</i>	88
3.4	NEVRITTUTVEKST I KORNCELLEKULTURER FRA LILLEHJERNE HOS KYLLING	90
3.5	PROLIFERASJON, DIFFERENSIERING OG MODNING AV KORNCELLEKULTURER FRA LILLEHJERNE HOS KYLLING	91

3.5.1	<i>Celleproliferasjon i korncellekulturer og påvirkning fra Ara-C</i>	92
3.5.2	<i>Differensiering av kornceller og påvirkning fra Ara-C</i>	93
3.5.3	<i>Migrering av kornceller og påvirkning fra Ara-C</i>	94
3.5.4	<i>Modning av kornceller og påvirkning fra Ara-C</i>	96
4.	DISKUSJON	100
4.1	DISKUSJON AV METODER	100
4.1.1	<i>Valg av cellemodeller</i>	100
4.1.2	<i>Valg av behandlinger i PC12-celler</i>	101
4.1.3	<i>Morfometrisk analyse i mikroskop</i>	102
4.1.4	<i>Valg av metode for å måle celledød</i>	103
4.1.5	<i>Westernblotting</i>	104
4.2	DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN	105
4.2.1	<i>Dex gir økte nevrittlengder via en GR-mediert signalvei i PC12-celler</i>	105
4.2.2	<i>Ara-C påvirker nevrittlengder i PC12-celler</i>	107
4.2.3	<i>Caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak NGF-indusert nevritutvekst i PC12-celler</i>	107
4.2.4	<i>PCNA som proliferasjonsmarkør i korncellekulturer, og effekter av Ara-C</i>	108
4.2.5	<i>NeuN som differensieringsmarkør i kornceller, og effekter av Ara-C</i>	109
4.2.6	<i>Pax 6 som markør for migrerende kornceller, og effekter av Ara-C</i>	110
4.2.7	<i>NR2A og NR2B som utviklingsmarkører i kornceller, og effekter av Ara-C</i>	111
4.2.8	<i>Veien videre</i>	112
5.	KONKLUSJON	113
	KILDELISTE	114

1. Innledning

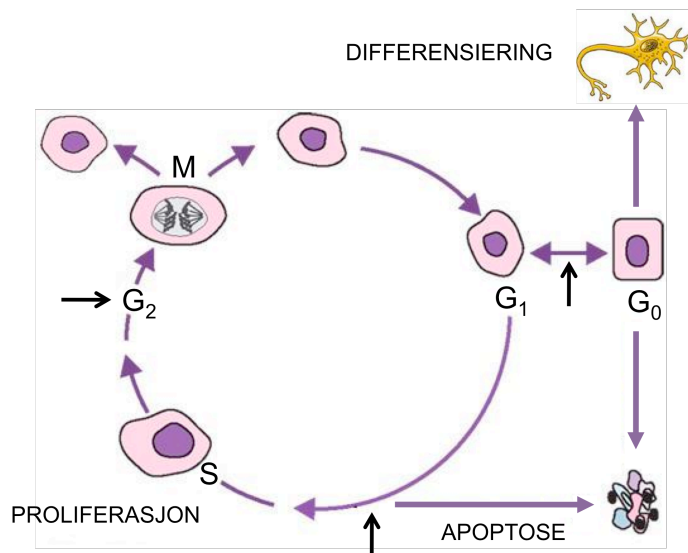
Utvikling av sentralnervesystemet avhenger av en rekke prosesser, inkludert celleproliferasjon, differensiering av forløperceller til nevroner, nevrutvekst og migrering. Disse prosessene kan påvirkes av legemidler, og hjernen er derfor spesielt sårbar for ytre påkjenninger når disse prosessene finner sted (Rice og Barone, 2000). Nervevekstfaktor (NGF) er viktig for nevroneal overlevelse, utvikling og funksjon, og uttrykkes under ulike stadier i utviklingen. Caspase-3 forbindes ofte med apoptose, men flere studier har vist at caspase-3 også kan være viktig for nevroneal differensiering (kap 1.1). I lillehjernen migrerer kornceller fra lillehjernebarkens ytre til indre lag, en prosess som er viktig for normal utvikling og funksjon av nevronene (kap 1.2). NMDA-reseptoren er viktig for korncellenes migrering, og sammensetning av ulike NMDA-reseptorsubenheter gir reseptoren ulike egenskaper (kap 1.3). Legemiddelet deksametason (Dex) administreres rutinemessig til kvinner med risiko for prematur fødsel, og har også blitt brukt postnatalt til premature barn. Flere retrospektive studier har vist at dette kan gi strukturelle og funksjonelle misdannelser av hjernen, blant annet i lillehjernen (kap 1.4). Enkle og gode *in vitro*-modeller som PC12-celler og kornceller fra lillehjerne hos kylling, kan brukes innen sikkerhetsfarmakologi for å studere om legemidler forstyrrer nevroneale utviklingsmekanismer (kap 1.5).

1.1 Hjernen under utvikling

1.1.1 Celleproliferasjon og differensiering

Cellesyklusen er en viktig prosess for proliferasjon og differensiering av nevroneale forløperceller. Den kan deles inn i fire faser: G_1 , S, G_2 og M (figur 1.1). Under M fasen (mitose-fasen) deler cellene seg asymmetrisk, og det produseres to identiske datterceller. I G_1 -fase kan cellene gå over i en G_0 -fase. G_0 er en hvilefase hvor cellene kan gå ut av cellesyklusen og differensiere, eller dø ved apoptose. Alternativt kan cellene gå inn igjen i cellesyklusen. I S-fasen replikerer cellene sitt DNA, og cellene forberedes på deling. I G_2 -fase foregår RNA- og proteinsyntesen, før cellene igjen når M-fase og deles ved mitose (Ohnuma og Harris, 2003). Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) er et viktig protein for replikasjon og

reparasjon av DNA, og uttrykkes av celler i sen G₁- og tidlig S-fase (Paunesku, *et al.*, 2001). Cellesyklusens progresjon kontrolleres av et komplekst samspill av mange ulike proteiner og hormoner (Ma, *et al.*, 2010). Tre viktige kontrollposter befinner seg ved G₁-, S- og G₂-fase, hvor cellenes skjebne mot proliferasjon, differensiering eller apoptose reguleres (figur 1.1).



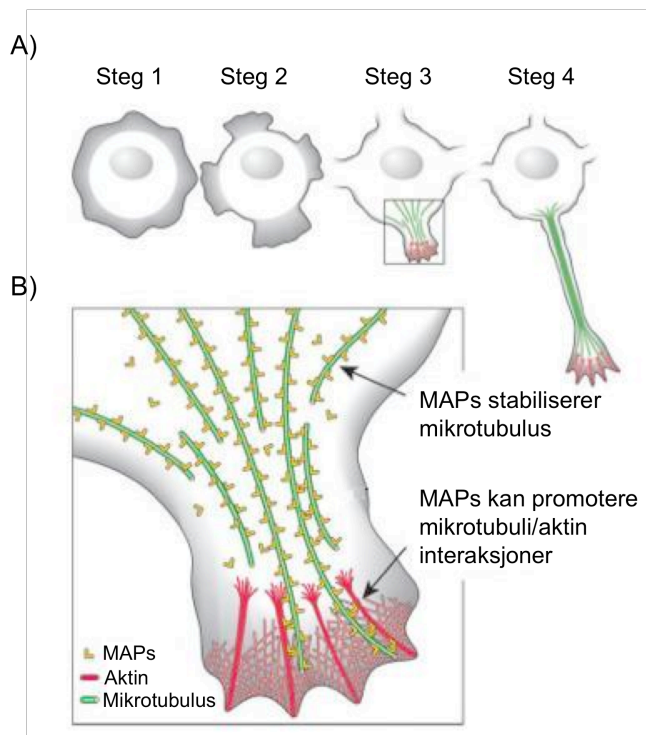
Figur 1.1. Forenklet fremstilling av cellesyklusen.

Figuren viser cellesyklusens fire faser, og cellenes alternative skjebner: proliferasjon, differensiering og apoptose. Cellesyklusen er under sterk regulering og kontroll, og tre viktige kontrollposter befinner seg ved G₁-, S- og G₂-fase. De tre kontrollpostene er angitt med piler. Figuren er modifisert fra (Dahl, *et al.*, 2009).

1.1.2 Nevrittutvekst

Nevrittutvekst er en viktig prosess for strukturell plastisitet, og forstyrrelser i nevrutvekst har blitt forbundet med dysfunksjoner av sentralnervesystemet hos både dyr og mennesker (Berger-Sweeney og Hohmann, 1997; Ramakers, 2002). I primære nevronkulturer brukes "nevritt" som et samlebegrep for aksoner og dendritter, mens det i nevronale cellelinjer brukes for å beskrive utvekster som ikke kan defineres som aksoner eller dendritter. Nevroner kjennetegnes morfologisk ved tilstedeværelse av nevrer, og nevrutvekst er en konsekvens av at forløperceller går ut av cellesyklus og differensierer (Radio, *et al.*, 2008a). Nevritter er tynne, dynamiske strukturer som strekker seg fra cellekroppen i ulike retninger, og kan danne forgreninger. Nevritter ender i en aktinrik tupp kalt nevrutens "growth cone" (Dehmelt og Halpain, 2004). Mikrotubuli og aktinfilamenter er deler av cellens cytoskjelett, og er viktig for vekst og stabilisering av nevrer. Mikrotubulus er bygd

opp av proteinet tubulin, en heterodimer som består av subenhetene α og β tubulin. Aktinfilamenter består av monomerer av proteinet aktin (Kamath, *et al.*, 2010). Nevrittutvekst kan deles inn i fire steg (figur 1.2 A); Cellen omringes først av et nettverk av aktinfilamenter. Aktinfilamenter akumuleres deretter i én eller flere brede utvekster, og utvekstene danner en "growth cone". Nevritter strekker seg fra cellekroppen ved at tubulin polymeriseres til kompakte kjeder, som strekker seg fra cellekroppen og ut til tuppen av nevritten. Polymerisering av aktin i "growth cone" styrer nevrittens bevegelse (Dehmelt og Halpain, 2004). Mikrotubulus-assosierte proteiner (MAPs) er viktig for stabilisering og vekst av mikrotubulus ved å hindre depolymerisering. Map 2 kan virke som et bindeledd mellom mikrotubuli og aktinfilamenter (figur 1.2 B) (Selden og Pollard, 1986).



Figur 1.2. Cytoskjelettets rolle under nevrittutvekst.

(A) Figuren viser fire steg ved nevrittutvekst. Steg 1: Aktin omringer cellen. Steg 2: Aktin akumuleres i brede utvekster. Steg 3: Utvekstene danner en "growth cone". Steg 4: Nevritter strekker seg fra cellekroppen ved polymerisering av tubulin og aktin. (B) Figuren viser interaksjoner mellom mikrotubuli, aktinfilamenter og MAPs i nevrittens "growth cone". Figuren er modifisert fra (Dehmelt og Halpain, 2004).

1.1.3 Effekter av nervevekstfaktor i sentralnervesystemet under utvikling

Nevrotrofiner er en familie vekstfaktorer, som er viktig for overlevelse, modning og funksjon av nevrone forløperceller under utviklingen av sentralnervesystemet. Nevrotrofiner uttrykkes ved ulike stadier i utviklingen, og regulerer ulike prosesser i flere områder av hjernen (Bartkowska, *et al.*, 2010). Nevrotrofiner er også viktig for normal opprettholdelse av sentralnervesystemet, hvor de kontrollerer synaptisk funksjon og plastisitet og nevroners overlevelse, morfologi og differensiering (Reichardt, 2006). Familien består av fire medlemmer: nervevekstfaktor (NGF), hjernederivert nevrotofisk faktor (BDNF), nevrotrofin-3 (NT-3) og nevrotrofin-4 (NT-4) (Ernfors, *et al.*, 1992). NGF ble karakterisert av Hamburger og Levi-Montalcini i 1949, som en inducer av fiberutvekst i sympatiske og sensoriske nevroner fra kyllingembryo (Hamburger og Levi-Montalcini, 1949). I motsetning til det perifere nervesystem, hvor NGF syntetiseres av flere ikke-nevrone celler, er NGF hovedsakelig lokalisert i nevroner i sentralnervesystemet (Zafra, *et al.*, 1990). Høye nivåer av NGF er funnet i hippocampus og hjernebarken (*cerebral cortex*). *In vivo* og *in vitro* studier i rotte har vist at frissettelse av NGF reguleres av eksitatoriske input og elektrisk aktivitet (Frade og Barde, 1998). I primærkultur fra hippocampus hos rotte er intracellulær NGF lokalisert i nevroners soma, dendritter og aksoner (Blochl og Thoenen, 1996). Studier i PC12-celler har vist at NGF har ulike effekter avhengig av hvor i celledivisjonszyklus cellene befinner seg; celler i G₁-fase går ut av celledivisjonszyklus og differensierer, mens celler i de andre fasene forblir i celledivisjonszyklus. NGF påvirker også uttrykket av regulatoriske proteiner, slik at celler arresteres i G₁-fase (Urdiales, *et al.*, 1998). Nevritutvekst induseres ved at NGF promoterer polymerisering av mikrotubulus (Drubin, *et al.*, 1985).

1.1.4 Nervevekstfaktorreseptorer

Effekter av NGF medieres via to ulike celleoverflatereseptorer: p75 nevrotrofin reseptor (p75^{NTR}) og tyrosin kinase A (trkA) reseptor. p75^{NTR} uttrykkes i stor grad under tidlig utvikling av sentralnervesystemet, hvor programmert celledød finner sted. Senere i utviklingen nedreguleres uttrykket av p75^{NTR} (Underwood og Coulson, 2008). TrkA-reseptoren uttrykkes av flere nevrone celler i ulike områder av hjernen (Holtzman, *et al.*, 1995). I lillehjernen hos mennesker uttrykkes trkA-reseptoren både under utvikling og i voksen alder (Quartu, *et al.*, 2003).

1.1.5 Caspaser og ikke-apoptotiske effekter

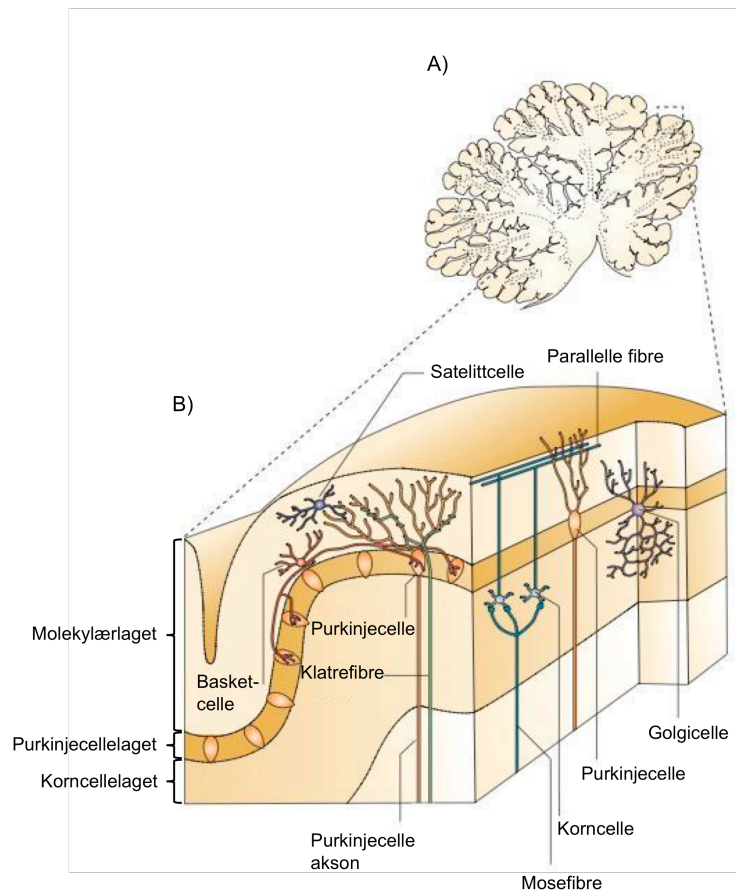
Caspaser er en familie cystein-proteaser, og er sentrale regulatorer av apoptose. I pattedyr består familien av 14 medlemmer, hvorav 11 er kjent i mennesker. 4 av medlemmene i caspasefamilien er involvert i inflammasjon, mens de resterende 7 er involvert i apoptose (Nicholson, 1999). De apoptotiske caspasene kan deles inn i to grupper på bakgrunn av deres substrat-spesifisitet. Initiatorcaspaser kløyver et fåtall av cellulære substrater, inkludert proformer av effektorcaspaser, og aktiverer dem. Aktiverte effektorcaspaser utfører deretter celledødsprogrammet. Caspase-3 anses som den viktigste effektorcaspasen ved apoptose (Greidinger, *et al.*, 1996). Flere studier har vist at caspaser også kan ha ikke-apoptotiske effekter, og spiller en rolle for regulering av proliferasjon og differensiering. Differensiering av skjelettmuskelceller, erytrocytter, myelomonocytiske celler, osteoblaster, keratinocytter og T-lymfocytter avhenger av caspase-3-aktivitet (Oomman, *et al.*, 2006). I sentralnervesystemet har ikke-apoptotiske effekter av caspase-3 blitt lokalisert i prolifererende områder i postnatal forhjerne hos rotte. Aktiv caspase-3 ble detektert ved fødsel, og uttrykket forble høyt frem til to uker etter fødsel (Yan, *et al.*, 2001). I en lignende studie fra postnatal lillehjerne hos rotte, ble det vist at prolifererende og differensierende celler i det ytre korncellelaget uttrykte aktiv caspase-3 i cytosol, mens migrerende kornceller og differensierte kornceller i det indre korncellelaget ikke uttrykte caspase-3 (Oomman, *et al.*, 2004). Ikke-apoptotiske effekter av caspase-3 har også blitt studert i PC12-celler. En midlertidig caspase-3-aktivitet ble observert ved fravær av celledød. Denne aktiviteten var nødvendig for rearrangering av cytoskjelettet og riktig cellemorfologi (Rohn, *et al.*, 2004). Substratsekvensen DEVD har blitt brukt til å lage caspase-3-hemmere, som for eksempel z-DEVD-cmk.

1.2 Lillehjernen under utvikling

Lillehjernen (*cerebellum*) består av over 50 milliarder nevroner, noe som utgjør nesten halvparten av totalt antall nevroner i hjernen (Zagon, *et al.*, 1977). Lillehjernen er involvert i motorisk kontroll, og ved skader på lillehjernen sees ukontrollerte bevegelser, balanseforstyrrelser, uttalevansker og skjelving ved utførelse av planlagte bevegelser (Stoodley, 2011). Kliniske og anatomiske rapporter har vist at lillehjernen også kan spille en rolle for evnen til å tilegne seg ny kunnskap. Funksjonelle bildediagnostiske studier har vist at lillehjernen aktiveres ved utførelse av flere kognitive oppgaver, inkludert språk og hukommelse (Baillieux, *et al.*, 2008). Kognitive, følelsesmessige og adferdsmessige endringer ved psykiatriske lidelser som autisme og schizofreni, har også blitt assosiert med strukturelle dysfunksjoner av lillehjernen. Lillehjernen danner afferente forbindelser med motoriske områder av hjernebarken (*cerebral cortex*), men også med områder som antas å være involvert i kognitiv funksjon (Timmann og Daum, 2007).

1.2.1 Lillehjernebarken

Lillehjernebarken (*cerebellar cortex*) er en sterkt foldet struktur som dekker hele lillehjernens ytre overflate. Lillehjernebarken består av 5 nevronale celletyper og glia, og kan deles inn i tre veldefinerte lag (figur 1.3): molekylærlaget, purkinjecellelaget og det indre korncellelaget. I molekylærlaget ligger purkinjecellenes dendritter, korncellenes parallelle fibre, gliafibre, basketceller og satelittceller. Purkinjecellelaget består av cellekroppene til purkinjecellene, og i korncellelaget ligger korncellenes cellekropper og golgiceller (Huard, *et al.*, 1999). Lillehjernebarken mottar informasjon fra andre deler av sentralnervesystemet via to afferente systemer, mosefibre og klatrefibre (Carletti og Rossi, 2008).



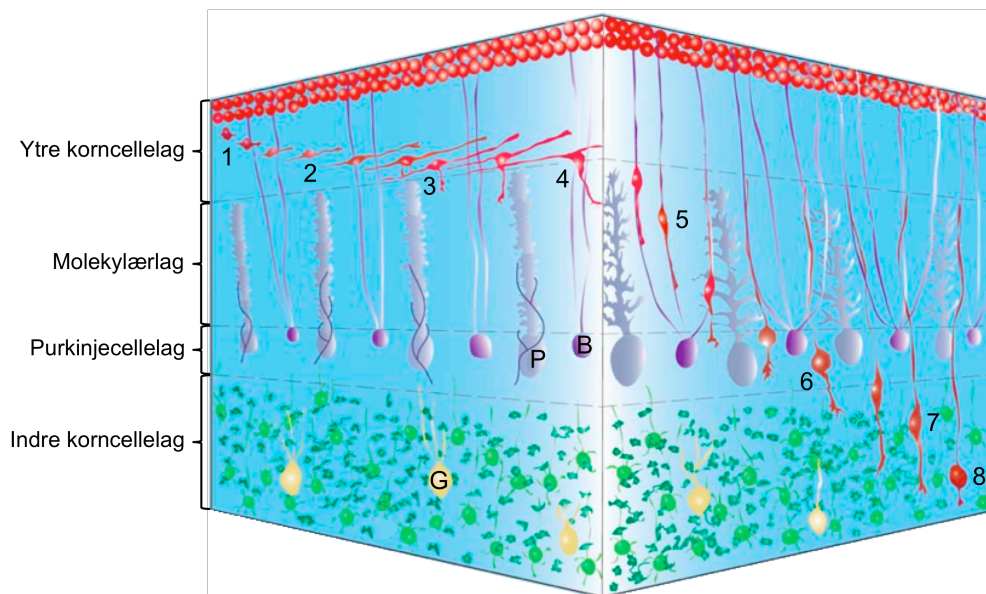
Figur 1.3. Lillehjernebarkens anatomiske oppbygning.

Lillehjernebarken består av tre distinkte lag: molekylærlaget, purkinjecellelaget og korncellelaget. I molekylærlaget befinner purkinjecellenes dendritter og korncellenes aksoner seg. Purkinjecellelaget inneholder purkinjecellenes cellekropper og i korncellelaget ligger korncellenes cellekropper som danner synaptiske forbindelser med mosefibre. A) Tverrsnitt av lillehjernen. B) Tverrsnitt av lillehjernebarken med dens tre lag og celletyper. Figuren er modifisert fra (Ramnani, 2006).

1.2.2 Migrering av kornceller i lillehjernebarken

Migrering av umodne nevroner til deres endelige destinasjon er en viktig prosess for normal organisering og funksjon av sentralnervesystemet, og legemidler kan virke forstyrrende på denne prosessen. Kornceller fra lillehjerne er en mye brukt modell for å studere nevronal migrering (Komuro og Yacubova, 2003). Korncellene stammer fra en germinal sone i rombic lip, og rundt embryonal dag 13 (E13) i mus danner de et sekundært prolifererende område i det ytre korncellelaget (Espinosa og Luo, 2008). Herfra migrerer de gjennom molekylærlaget, purkinjecellelaget, og ender opp i det indre korncellelaget hvor de blir værende som modne kornceller (Carletti og Rossi, 2008) (figur 1.4). I mus befinner korncellene seg i det ytre korncellelaget et sted mellom E15 og postnatal dag 15 (P15). I denne perioden uttrykker korncellene Pax 6, et DNA-bindende protein som er involvert i nevronenes

migrering (Chung, *et al.*, 2010). Etter P15 avtar proliferasjonen, korncellene går ut av cellesyklus og differensierer (Carletti og Rossi, 2008). NeuN er et nevrospesifikt protein, og uttrykkes på utviklingstidspunkter etter at nevronene har gått ut av cellesyklus (Mullen, *et al.*, 1992). Postmitotiske kornceller i det ytre korncellelaget sender ut to horisontale aksoner som har ulik lengde, og beveger cellekroppene sine langs det lengste aksonet. Ved overgangen mellom det ytre korncellelaget og molekylærlaget, sender korncellene ut et tredje akson vertikalt inn i molekylærlaget. De migrerende korncellene endrer så retning fra en tangentiell til en radiell bevegelse, og beveger seg langs fibre til bergmanglia-celler gjennom molekylærlaget. Under denne migreringen får korncellene en avlang cellekropp (Komuro, *et al.*, 2001). Etter at korncellene har nådd purkinjecellelaget, skilles de fra bergmanglia-cellerne og beveger seg med en redusert hastighet. Cellekroppene får nå en globulær form. Ved overgangen mellom purkinjecellelaget og det indre korncellelaget øker migreringshastigheten, og korncellene når det indre korncellelaget hvor modningen fullføres. Her sender korncellene ut dendritter som danner synaptiske forbindelser med mosefibre og golgiceller. Korncellenes lange aksoner forblir i molekylærlaget som T-formede parallelle fibre, og danner synaptiske forbindelser med purkinjecellenes dendritter (Komuro og Rakic, 1998). I mus tar det indre korncellelaget form rundt P5, og innen P20 er modningen fullført (Espinosa og Luo, 2008). Ved å isolere kornceller fra kylling ved E18, oppnås korncellekulturer som tilsvarer P7 i rotte og mus (Chuong, *et al.*, 1987).



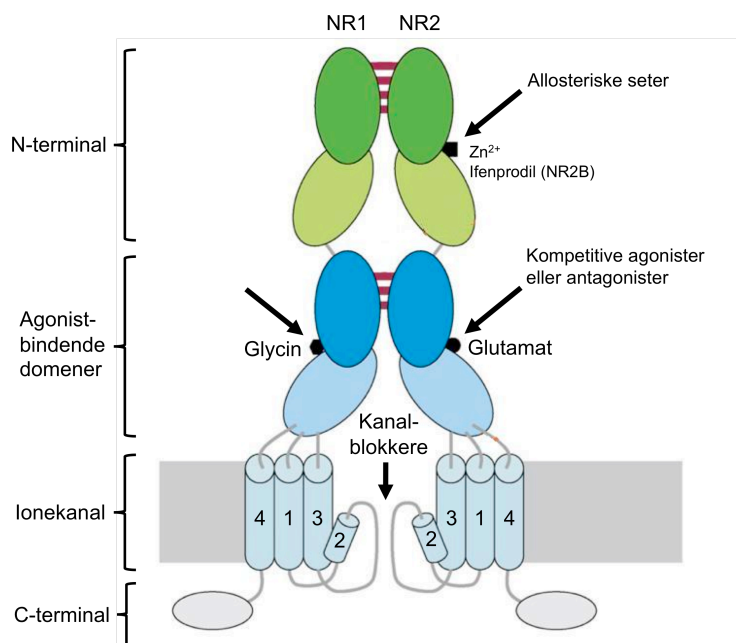
Figur 1.4. Korncellenes migrering gjennom lillehjernerbarkens tre lag.

Figuren viser korncellenes migrering i det ytre korncellelaget (1-3), bergmanglia-assosiert migrering gjennom molekylærlaget (4-5), stasjonær fase i purkinjecellelaget (6) og bergmanglia-uavhengig migrering til korncellenes endelige mål i det indre korncellelaget (7-8). Forkortelser: P, purkinjecelle; B, bergmanglia-celle; G, golgicelle. Figuren er modifisert fra (Komuro og Yacubova, 2003).

1.3 Effekter av NMDA-reseptoren i lillehjernen under utvikling

N-metyl-D-aspartat (NMDA) reseptoren tilhører eksitatorisk ionotrope glutamatreseptorer, og er en ligandstyrt ionekanal i cellemembranen. NMDA-reseptoren er distribuert over hele sentralnervesystemet, både synaptisk og ekstrasynaptisk (Cull-Candy, *et al.*, 2001; Furukawa, *et al.*, 2005). NMDA-reseptoren er et heterogent kompleks, sammensatt av varianter av tre ulike subtyper: NR1, NR2 og NR3. Ved alternativ spleising av ett enkelt gen dannes åtte ulike NR1-subenheter. Seks separate gener koder for fire ulike NR2-subenheter (NR2A-D) og to ulike NR3-subenheter (NR3A-B). Ulike kombinasjoner av de individuelle subenhetene gir reseptoren ulike funksjonelle egenskaper (Cull-Candy, *et al.*, 2001). Funksjonelle NMDA-reseptorer er heterotetramerer sammensatt av to glycinbindende NR1-subenheter og to glutamatbindende NR2-subenheter. NR3-subenheter kan ikke danne funksjonelle reseptorer alene, men kan ko-uttrykkes sammen med NR1- og NR2-subenheter og modulere NMDA-reseptoraktiviteten (Chatterton, *et al.*, 2002). NMDA-reseptorsubenhetene har fire funksjonelle områder (figur 1.5) – et ekstracellulært N-terminal domene, et ekstracellulært ligandbindende domene, et transmembran domene bestående av tre segmenter (TM 1, 3, 4) og en løkke som danner selve ionekanalene (M2) og et intracellulært C-terminal domene

(Paoletti og Neyton, 2007). For å aktivere reseptoren må koagonistene glycin og glutamat være bundet til sine respektive seter. Mg^{2+} er en negativ regulator av reseptoraktivitet. Zn^{2+} og polyaminer har også egne bindingsseter på NMDA-reseptoren, og kan modulere reseptorens aktivitet (Cull-Candy, *et al.*, 2001). Aktivisering og åpning av ionekanaler fører til influks av kationer inkludert Ca^{2+} , og dermed aktivisering av Ca^{2+} -avhengige mekanismer (Furukawa, *et al.*, 2005).



Figur 1.5. NMDA-reseptorens sammensetning.

NMDA-reseptoren er en heterotetramer sammensatt av to NR1- og to NR2-subenheter. For enkelthets skyld, er bare én av de to NR1/NR2 heterodimerne vist. Figuren viser NMDA-reseptorsubenheterenes fire distinkte domer, med bindingsseter for koagonistene glycin og glutamat og modulatoren Zn^{2+} . Ionekanalen kan blokkeres av kanalblokkere, som endogent Mg^{2+} . Figuren er modifisert fra (Paoletti og Neyton, 2007).

I lillehjernen spiller NMDA-reseptorer en viktig rolle for nevronal differensiering, etablering av funksjonelle synapser og migrering av umodne kornceller (Komuro og Rakic, 1993). NMDA-reseptorer på overflaten til migrerende kornceller kan aktiveres spontant. Kornceller som befinner seg i det ytre korncellelaget har lav frekvens av spontan reseptoraktivitet, mens frekvensen er høy hos celler i molekylærlaget (Rossi og Slater, 1993). Studier har vist at endringer i Mg^{2+} - og glycinkonsentrasjon påvirker korncellenes migrering. Mg^{2+} blokkerer NMDA-reseptoraktivitet på en spenningsavhengig måte. Studier i kornceller fra mus har vist at ved å fjerne Mg^{2+} fra mediet øker korncellenes migrering i molekylærlaget. Denne effekten sees også ved tilsats av agonisten glycin (Komuro og Rakic, 1993). Svingninger i intracellulær

Ca^{2+} -konsentrasjon er også viktig for migreringsprosessen, og frekvensen av Ca^{2+} -svingninger korrelerer positivt med korncellenes migreringshastighet. Studier i mus har vist at blokkering av Ca^{2+} -influks over plasmamembranen fører til en hemmet bevegelse (Komuro og Rakic, 1996). Under utvikling av lillehjernen endres uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter, og uttrykk av NMDA-reseptorer med spesifikke subenhets sammensetninger har vist seg å ha betydning for korncellenes migrering. NR1-subenheter uttrykkes jevnt under hele utviklingen, mens de fire NR2-subenheterne har variable uttrykk på ulike tidspunkter (Watanabe, *et al.*, 1993). Migrerende kornceller uttrykker NR1-, NR2A- eller NR2B-subenheter sammen, mens modne korneller i det indre korncellelaget uttrykker NR1 og NR2C. Dette tyder på at det er NR2-subenheten som er viktig for migreringsprosessen (Farrant, *et al.*, 1994; Monyer, *et al.*, 1994). I kornceller fra lillehjerne hos rotte har det tidligere blitt vist at ifenprodil, en spesifikk NR2B-subenhet antagonist, hemmer korncellenes migrering inn i det indre korncellelaget (Mancini og Atchison, 2007). Uttrykket av NR2B-subenheten er høyt under embryonal og neonatal fase, mens uttrykket av NR2A-subenheten øker etter hvert som lillehjernen modnes og korncellene nærmer seg det indre korncellelaget (Snell, *et al.*, 2001). I kornceller fra lillehjerne hos rotte og mus er endringen i uttrykket av subenheterne beskrevet som en "developmental switch", hvor uttrykket av NR2A øker og uttrykket av NR2B synker (Fu, *et al.*, 2005; Mancini og Atchison, 2007).

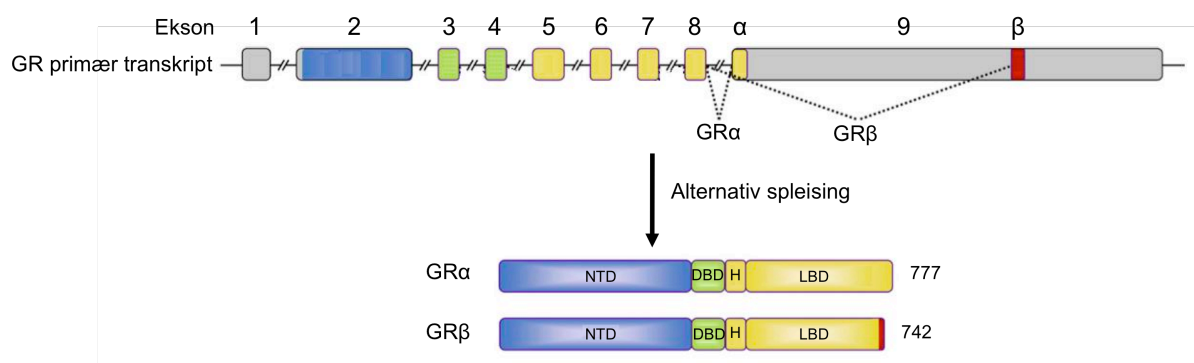
1.4 Effekter av glukokortikoider i sentralnervesystemet under utvikling

Steroider er hormoner som dannes ved trinnvis omdanning av kolesterol, og kan deles inn fem grupper avhengig av hvilke reseptorer de bindes til: glukokortikoider, mineralokortikoider, androgener, østrogener og progesteroner. Glukokortikoider regulerer mange fysiologiske funksjoner, deriblant metabolisme, inflammasjon, cellevekst, proliferasjon og differensiering (Greenberg, *et al.*, 2002). Perifere steroidhormoner kan krysse blod-hjerne-barrieren, og regulere nevronale funksjoner i hjernen (McEwen, 1987). Hjernen syntetiserer også steroider *de novo* fra kolesterol, såkalte nevrosteroider. Nevrosteroider kan utøve både genomiske effekter mediert via steroidreseptorer, og ikke-genomiske effekter mediert via neurotransmittor-reseptorer som GABA_A (Monnet og Maurice, 2006). Endogene

glukokortikoider er viktig for normal modning av hjernen, og for høye eller for lave konsentrasjoner av glukokortikoider kan føre til strukturelle og funksjonelle forandringer (Lupien, *et al.*, 2009). Under normale forhold er overgangen av endogene glukokortikoider fra mor til foster lav. Enzymet 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) uttrykkes i placenta, og omdanner glukokortikoider til inaktive metabolitter. Syntetiske glukokortikoider metaboliseres derimot ikke av dette enzymet, og kan overføres til fosteret (Benediktsson, *et al.*, 1997). Dyrestudier har vist at administrering av syntetiske glukokortikoider kan påvirke fosterets utvikling av hypotalamus-hypofyse-binyre (HPA) aksen, og resultere i irreversible endringer i HPA-funksjon (Kapoor, *et al.*, 2008). En stress-indusert økning av glukokortikoider i morens blod under graviditet har også blitt korrelert med dysfunksjoner av fosterets hjerne (Meaney, *et al.*, 1996). Både i dyr og mennesker har det blitt vist at administrering av glukokortikoider under graviditet fører til redusert kroppsvekt ved fødsel (Bloom, *et al.*, 2001; Newnham, *et al.*, 1999).

1.4.1 Glukokortikoidreseptoren

Glukokortikoidreseptoren (GR) er et intracellulært protein, og tilhører steroid-tyroidea-retinoidreseptorfamilien. GR fungerer som en ligand-avhengig transkripsjonsfaktor, og regulerer uttrykket av glukokortikoidresponsive gener. GR-proteinet består av tre distinkte domener: et N-terminal domene (NTD), et DNA-bindende domene (DBD) og et ligand-bindende domene (LBD). GR-genet består av 9 eksoner, og alternativ spleising av ekson 9 resulterer i to ulike isotyper (figur 1.6): GR α binder glukokortikoider, mens GR β binder DNA og fungerer som en negativ regulator av transkripsjonsaktiviteten til GR α (Nicolaidis, *et al.*, 2010). I inaktiv form foreligger GR som et multiproteinkompleks i cytoplasma, bundet til to heat-shock proteiner (HSP) og flere immunofiliner. Når GR aktiveres av ligand dissosierer proteinene fra reseptoren, og GR translokaliseres inn i kjernen. Innen i kjernen danner reseptoren en homodimer, og bindes til spesifikke DNA-sekvenser kalt glukokortikoid-responselementer (GRE). Avhengig av om GR bindes til positive eller negative GRE, vil transkripsjon av målgenet henholdsvis aktiveres (transaktivering) eller undertrykkes (cisrepresjon). Monomerisk GR kan alternativt interagere med transkripsjonsfaktorene AP-1 og NF- κ B, og undertrykke aktivering av deres pro-inflammatoriske målgener (transrepresjon) (Zhou og Cidlowski, 2005).



Figur 1.6. Glukokortikoidreseptorens struktur.

Isotypene GR α og GR β er et resultat av alternativ spleising av ekson 9. NTD=N-terminal domene, DBD=DNA-bindende domene og LBD=ligand-bindende domene. Figuren er modifisert fra (Oakley og Cidlowski, 2011).

1.4.2 Mineralkortikoidreseptoren

I likhet med GR, er mineralkortikoidreseptoren medlem av steroid-tyroidea-retinoidreseptorfamilien av ligand-avhengige transkripsjonsfaktorer. I likhet med alle medlemmer av denne familien, består reseptoren av et N-terminal domene, et DNA-bindende domene og et ligand-bindende domene. MR er en høy-affinitets reseptor for mineralkortikoider som aldosteron, men har også affinitet for glukokortikoider. Når MR aktiveres av ligand, translokaliseres reseptoren til kjernen. Her binder den seg som en homodimer til mineralkortikoid-/glukokortikoid-resonselementer (MRE/GRE), og regulerer transkripsjonen av målgenet (Fuller og Young, 2005). GR og MR deler mange funksjonelle og strukturelle likheter, og det har tidligere blitt foreslått at GR og MR oppstod fra samme forløper (Baker, 2001).

1.4.3 Deksametason

Dex er et høypotent syntetisk glukokortikoid med sterk antiinflammatorisk og immunsuppressiv effekt. Dex er en potent GR agonist, men har også affinitet for MR (van Leeuwen, *et al.*, 2010). Dex har mange bruksområder, og blir blant annet brukt til å behandle optikusnevritt og multippel sklerose hos gravide kvinner (Ferrero, *et al.*, 2004). Dex administreres også til kvinner med risiko for prematur fødsel, og har blitt gitt postnatalt til premature barn for å forebygge og behandle bronkopulmonal dysplasi (Aden, *et al.*, 2008). Dex gitt prenatalt akselererer lungemodningen og modningen av surfaktantproduserende type II pneumocytter. Pulmonære surfaktanter er en blanding av fosfolipider og surfaktantproteiner, og i luftfylte lunger

etter fødsel er surfaktanter nødvendig for å minske overflatespenningen ved luft-væske-overflaten i alveolene (Bolt, *et al.*, 2001). Entusiasmen for å gi steroider til premature barn i begynnelsen av 1990-årene førte til en rask økning i bruken (Hack og Fanaroff, 1999). I en oppfølgingsstudie som fulgte barn frem til skolealder, ble det vist at tidlig postnatal Dex-terapi gav svekket motoriske ferdigheter, koordinering og kognitiv funksjon (Yeh, *et al.*, 2004). Andre store randomiserte studier har gitt tilsvarende resultater (O'Shea, *et al.*, 1999; Shinwell, *et al.*, 2000). GR antagonist mifepriston og MR antagonist RU28318 har blitt brukt for å kartlegge hvilke reseptorer som er involvert i effekter av Dex.

1.4.4 Effekter av deksametason i sentralnervesystemet under utvikling

GR og MR er distribuert i flere områder av hjernen, og uttrykket av de to reseptorene i ulike områder kan variere fra art til art. I rotte er nivået av GR og MR lavt i den embryonale perioden, mens uttrykket øker rundt fødsel (Rosenfeld, *et al.*, 1993; van Eekelen, *et al.*, 1991). I rotte er GR funnet i store deler av hjernen, deriblant hippocampus og lillehjernen (Sousa, *et al.*, 1989). MR er funnet i striatum, hippocampus og lillehjernen (Numachi, *et al.*, 2000). Syntetiske glukokortikoider som Dex kan derfor trolig ha effekt på hjernen under utvikling (Owen og Matthews, 2003). Flere retrospektive studier i mennesker har indikert at glukokortikoider gitt postnatalt kan gi langtidseffekter på hjernens struktur, adferd og endokrine funksjoner (French, *et al.*, 2004; Murphy, *et al.*, 2001). Glukokortikoider har også vist seg å være involvert i nevronal celledød, og Dex induserer celledød i kornceller fra lillehjerne hos kylling (Aden, *et al.*, 2008). I kornceller fra hippocampus hos rotte har det blitt vist at aktivering av MR beskytter nevronene, mens GR-aktivering gir nevronal celldød (Almeida, *et al.*, 2000). I en studie hos premature barn ble det vist at barn som hadde blitt behandlet med Dex postnatalt hadde en 20 % mindre lillehjerne, sammenlignet med premature barn som ikke hadde fått steroidbehandling (Parikh, *et al.*, 2007). Dex har også vist å redusere proliferasjon av celler i lillehjernen hos mus og i hippocampus hos rotte (Heine og Rowitch, 2009; J. B. Kim, *et al.*, 2004). I cellelinjer har det blitt vist at Dex hemmer celleproliferasjonen ved å arrestere mitotiske celler i G₀-/G₁-fase i cellyklusen (Crochemore, *et al.*, 2002; Greenberg, *et al.*, 2002).

1.5 Sikkerhetsfarmakologi

Den vanligste grunnen til at farmasøytiske preparater trekkes fra markedet er at preparatene gir alvorlige reaksjoner, med sentralnervesystemet som målorgan i mange av tilfellene (Valentin og Hammond, 2008). Sikkerhetsfarmakologi er definert som studier av potensielt uønskede farmakodynamiske effekter av et legemiddel på fysiologiske funksjoner ved eksponering i det terapeutiske området eller over (ICH S7A, 2001). Sikkerhetsfarmakologi oppstod på bakgrunnen av at toksikologiske tester ofte ikke fanget opp uønskede effekter av nye farmasøytiske preparater på vitale organfunksjoner. I 2001 implementerte den farmasøytiske industrien internasjonale retningslinjer (ICH S7A) for hvordan sikkerhetstesting av nye legemidler skal utføres. I følge ICH S7A skal sikkerhetsfarmakologiske studier identifisere, evaluere og karakterisere potensielt uønskede farmakodynamiske egenskaper av et legemiddel før kliniske studier utføres (Pugsley, 2005). Testene skal studere effekter på vitale organsystemer, inkludert sentralnervesystemet, respirasjonssystemet og det kardiovaskulære systemet. Gode og enkle *in vitro*-modeller som kan brukes på et tidlig stadium i den sikkerhetsfarmakologiske evalueringen er ønskelig. Slike modeller kan fange opp uønskede effekter og mekanismene av disse av et legemiddel, før kliniske studier startes (Wakefield, *et al.*, 2002). Ved bruk av cellepopulasjoner som ikke krever dyrestall-fasiliteter, tas det også hensyn til dyrs velferd og beskyttelse. Cellelinjer og vev fra cellelinjer gir i tillegg mindre allergi for analytikeren.

1.5.1 PC12-celler som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi

PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje med opphav fra feokromocytom hos rotte (Greene og Tischler, 1976). I respons til NGF differensierer PC12-celler til en sympatisk nevronlignende fenotype, karakterisert av nevrutvekst, uttrykk av nevronal-spesifikke proteiner, syntese av nevrotransmittere og tilhørende reseptorer og elektrisk aktivitet (Radio, *et al.*, 2010). PC12-celler uttrykker også endogen GR og MR (Goto, *et al.*, 2009). PC12-celler er en vel-karakterisert modell egnet for å studere nevronal differensiering og nevrutvekst (Fujita, *et al.*, 1989). PC12-celler har også blitt foreslått som en "screening"-modell, for å studere effekter av kjemikalier på nevronal utvikling (Radio og Mundy, 2008b).

1.5.2 Kornceller fra lillehjerne hos kylling som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi

Kornceller fra lillehjerne utgjør mer enn 90 % av nevronene i lillehjernen (Contestabile, 2002). Korncellekulturer fra rotte og mus brukes ofte som *in vitro* modeller i nevrobiologiske studier (Vaudry, *et al.*, 2003). Ulemper ved bruk av disse modellene er at det følger med et krav om dyrestall-fasiliteter. Korncellekulturer fra kylling krever ikke dyrestall-fasiliteter og er mindre kostbart i bruk. Lillehjernens utvikling og nevronale modning er i tillegg vel-karakterisert (Jacobs, Aden, *et al.*, 2006). Ved å behandle korncellekulturer med den antimitotiske forbindelsen Ara-C, oppnås kulturer som hovedsakelig består av nevroner. Det er derimot ukjent hvor korrekt behandling med Ara-C reflekterer nevronene i lillehjernen *in vivo*. Primære nevronkulturer har blitt foreslått som en "screening"-modell, for å studere effekter av kjemikalier på nevronal utvikling (Radio og Mundy, 2008b).

1.6 Mål med oppgaven

Det overordnede målet har vært:

Vurdere PC12-celler og kornceller fra lillehjerne hos kylling som nevrobiologiske modeller innen sikkerhetsfarmakologi, for å studere effekter på nevronal utvikling.

Delmålene har vært:

1. Sammenligne hvor følsomme PC12-celler er for fire ulike endepunkter for nevrutvekst, induert av legemiddelet Dex, NGF og Ara-C.
2. Studere hvorvidt GR og caspase-3 er involvert i mekanismer for nevrutvekst induert av Dex og NGF i PC12-celler.
3. Å bruke PCNA som markør for å karakterisere korncellekulturers proliferasjon i kultur over tid.
4. Å bruke NeuN, Pax 6, NR2A og NR2B som markører for å karakterisere korncellers differensiering og utvikling i kultur over tid.
5. Studere hvorvidt Ara-C påvirker uttrykket av PCNA, NeuN, Pax 6, NR2A og NR2B i korncellekulturer.

2. Materialer og metoder

2.1 Oversikt over kjemikalier og biologiske produkter

Tabell 2.1. Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamide/ BIS solution, 30 %	Bio-Rad Laboratories, Inc., Japan
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland
Ara-C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland
BCA TM Protein Assay Kit	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
BME	Invitrogen Gibco Grand Island, N.Y., USA
Bromfenolblå	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
CaCl ₂ (kalsiumklorid)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Deksametason	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
(DEVD) ₂ -R110	Bachem Bioscience, Inc., USA
DMEM	Invitrogen Gibco Grand Island, N.Y., USA
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
DNase1 D5025	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Etanol, 99,9 % (absolutt alkohol)	Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge
FBS	Invitrogen Gibco Grand Island, N.Y., USA
Fenolrødt	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Glukose	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Glyserol, 87 %	VWR Fontenay sous Bois, Frankrike
HCl (hydrogenklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Hesteserum (varmeinaktivert)	Invitrogen Gibco Grand Island, N.Y., USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Insulin (fra bukspyttkjertel hos kalv)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
KCl (kaliumklorid)	VWR Leuven, Belgia
KH ₂ PO ₄ (kaliumdihydrogenfosfat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Metanol	VWR Fontenay sous Bois, Frankrike
MgSO ₄ (magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Mifepriston (RU38486)	Tocris Bioscience Ellisville, USA
NaCl (natriumklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaHCO ₃ (natriumbikarbonat)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland

Na ₂ HPO ₄ (di-natriumhydrogenfosfatdihydrat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaOH (natriumhydroksid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Na ₂ SnO ₃ (natriumselenitt)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Natrium deoxycholate monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Natriumpyruvat	Invitrogen Grand Island, N.Y., USA
Na ₃ VO ₄ (natrium orthovanadate)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
NGF	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	Invitrogen Gibco Grand Island, N.Y., USA
Pepstatin-A	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Ponceaus solution	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Putrescin	Sigma-Aldrich, GmbH Steinheim, Tyskland
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
RU28318	Tocris Bioscience Ellisville, USA
SDS	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Supersignal™ West Femto	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
Supersignal™ West Pico	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, GmbH Steinheim, Tyskland
Transferrin, 97 % (humant)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Tris base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Tris/Glycin, 10X	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Tris/Glycin/SDS, 10X	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Trypanblå	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
Trypsin T9201	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Trypsinhemmer T9003	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Tween 20	Merck Calbiochem Darmstadt, Tyskland
Tørrmelk	Normilk AS, Norge
T ₃ (3,3',5-trijod-L-tyronin)	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH Steinheim, Tyskland
Z-DEVD-cmk	Bachem Bioscience, Inc., USA

Forkortelser er brukt i henhold til tidligere oversikt.

Tabell 2.2. Utstyr

Utstyr	Leverandør
Brett, 96-brønner	Nunclon, Thermo Scientific Rockford, USA
Cellekulturflasker 175 cm ²	Nunclon, Thermo Scientific Rockford, USA
Cellekulturskåler	Nunclon, Thermo Scientific Rockford, USA
Celleskrape	Corning Incorporated Corning, USA
CO ₂ -inkubatorskap	Thermo Scientific Rockford, USA
Finnpipette	Thermo Scientific Rockford, USA
Fluorescensmikroskop	Eclipse TE300 med SPOT RT, Nikon Melville, USA
Fremkallingsmaskin	Chemi Genius ² Bio Imaging System, Syngene Frederick, USA
Gassbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences Zizers, Sveits
Inkubatorskap	Termaks Bergen, Norge
Kamera til fluorescensmikroskop	Digital Sight DS-U2, Nikon Melville, USA
LAF-benk	Holten Safe 2000, modell 1.2, Thermo Scientific Rockford, USA
Lysmikroskop	TMS-F 104, Nikon Melville, USA
pH-meter	744 pH-meter, Metrohm Zofingen, Sveits
Pipetboy	Integra Biosciences Zizers, Sveits
Pipetter (sterile)	Corning Incorporated Corning, USA
Plateleser	HTS 7000 Plus Bio Assay Reader, Perkin-Elmer Massachusetts, USA

2.2 Korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling

2.2.1 Korncellekulturer

Kornceller fra rotte og mus er hovedsakelig postnatale og gir vel-karakteriserte primærkulturer. Kornceller er den største og mest homogene nevronpopulasjonen i lillehjernen, og hjernen som helhet (Contestabile, 2002). Korncellekulturer er derfor en god *in vitro* modell for å studere nevronale utviklingsmekanismer.

2.2.2 Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler

Dagen før preparering av korncellekulturer behandles skålene med poly-L-lysin, for å bedre cellenes adhesjon og vekst.

1. 5 mg poly-L-lysin fortynnes i 10 ml autoklavert MQ-vann. Blandes godt.
2. Løsningen overføres til en steril glasskolbe og fortynnes til 0,01 mg/ml i 500 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen blandes godt til all poly-L-lysin er løst.
3. 1 ml poly-L-lysin-løsning tilsettes små skåler (8,8 cm²), 2 ml tilsettes medium skåler (21,5 cm²) og 5 ml tilsettes store skåler (66,5 cm²). Skålene beveges rundt slik at hele overflaten dekkes.
4. Poly-L-lysin-løsningen pipetteres av etter 30-60 minutter. Skålene tørkes over natt i LAF-benk med luftstrøm på maksimal styrke.

2.2.3 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg kjøpes fra Nortura Samvirkerkylling i Våler. Avlskyllingene er av arten *Gallus gallus*, og typen ROSS 308. Eggene oppbevares kjølig i inntil 5 døgn før de legges i en rugemaskin. Eggene ruges i rugemaskinen ved en konstant temperatur på 37-39 °C, og fra dag 4 til dag 18 vendes eggene maskinelt morgen og kveld. Vann tilsettes et eget kammer i rugemaskinen, for å opprettholde en tilfredsstillende luftfuktighet. På dag 7 gjennomlyses eggene, og ubefruktede egg fjernes. På dag 17-18, tre til fire dager før normal klekkesetid, tas eggene ut av rugemaskinen. Eggene gjennomlyses, og egg som inneholder døde kyllingfostre fjernes. Egg med levende kyllingfostre legges i isvann før prepareringen. Preparering av kyllingkorncellekulturer foregår i LAF-benk med sterilt utstyr (tabell 2.3).

Tabell 2.3. Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer

Saks og pinsett til disseksjon av hjernen
2 pinsetter til å fjerne hjernehirner
Trypsineringsflaske
Glassflasker til løsningene 1-5
Petriskåler
50 ml glassrør
Pasteurpipette

Prosedyre for preparering av korncellekulturer

1. 8 egg av gangen legges 7 minutter i isvann for å bedøve kyllingfostrene.
2. Eggene vaskes i 70 % etanol.
3. Eggene knekkes i sterile petriskåler, og kyllingfostrene avlives med en steril skalpell ved rask dekapitering.
4. Hodene fraktes til LAF-benken hvor lillehjernen dissekteres ut ved hjelp av saks og pinsett. Lillehjernen legges i en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.4).
5. Lillehjernen renses for hjernehinne, og legges i en ny stor petriskål med løsning 1.
6. Løsning 1 suges av, og lillehjernen samles i en haug på midten av skålen. Hjernene kuttet i mindre biter i to retninger vinkeltrett på hverandre, og 10 ml løsning 1 tilsettes skålen.
7. Hjernebitene fordelt i løsning 1 overføres til et sterilt 50 ml rør, og tilsettes 10 ml løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
8. Supernatanten fjernes, og pelleten tilsettes 8 ml løsning 2 (tabell 2.4). Det pipetteres forsiktig opp og ned et tilstrekkelig antall ganger for å løse opp pelleten.
9. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske, og settes på vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Korkene skrues halvveis på, og flasken rystes forsiktig med jevne mellomrom.
10. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp, og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.4). Røret fylles opp med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten etter sentrifugering ikke er klar, tilsettes røret en liten mengde løsning 3 (tabell 2.4) og sentrifugeringen gjentas.
11. Supernatanten fjernes og røret tilsettes 3 ml løsning 3.

12. Cellene homogeniseres ved å pipettere pelleten forsiktig opp og ned med en steril pasteurpipette, som er brent av på tuppen for å få en rund og smal åpning. Løsningen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger til løsningen blir blakket.
13. La røret stå slik at de tyngste klumpene synker til bunnen. Den øverste klumpefrie delen av løsningen overføres til et sterilt 50 ml rør, tilsatt 15 ml løsning 5 (tabell 2.4).
14. 2 ml løsning 3 tilsettes røret med celleklumper. Punkt 12-13 gjentas helt til alle celleklumpene har løst seg, og løsningen får et blakket utseende. Løsningen overføres til røret med løsning 5, og sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
15. Supernatanten fjernes og 10 ml platemedium med serum (tabell 2.6) tilsettes.
16. Pelleten løses og celleduspensjonen overføres til en steril glassflaske, tilsatt halvparten av den mengden platemedium med serum beregnet ut fra antall preparerte hjerner. Det regnes 15-20 ml medium med serum per hjerne. Løsningen blandes godt.
17. En liten prøve av celleduspensjonen tas ut til telling i et Bürchers tellekammer. Celleduspensjonen fortynnes i platemedium med serum til en tetthet på $1,7 \times 10^6$ celler/ml medium. Mengde platemedium med serum beregnes ut fra følgende formel:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml celleduspensjon} \times \text{celletetthet per ml celleduspensjon}}{\text{Ønsket celletetthet per ml}}$$

18. Celleduspensjonen overføres til skåler, coatet med poly-L-lysin dagen før. Mengde celleduspensjon per skål er angitt i tabell 2.7.
19. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO₂.

Tabell 2.4. Løsninger til preparering av korncellekulturer

Løsning	Komponenter	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin (BSA)	1,50 g
	Krebs-Ringer-løsning (10X) (tabell 2.5)	50 ml
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	4,0 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin (T9201)	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	Trypsinhemmer (T9003)	26,0 mg
	DNase1 (D5025)	6,25 mg
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	0,50 ml
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 1	100 ml
	Løsning 3	16 ml
Løsning 5	Løsning 1	40 ml
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	320 µl
	CaCl ₂ (12,0 mg/ml destillert vann)	320 µl

Løsning 2-5 sterilfiltreres (0,2 µm)

Tabell 2.5. 10X Krebs-Ringer-løsning

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
NaCl	35,35 g	1,21 M
Glukose	12,85 g	0,14 M
NaHCO ₃	10,70 g	0,25 M
KCl	1,80 g	48 mM
KH ₂ PO ₄	0,83 g	12 mM
Fenolrødt	50 mg	0,3 mM
Destillert vann	ad 500 ml	
<ul style="list-style-type: none"> • Sterilfiltreres (0,2 µm) • Oppbevares ved 2-8 °C i inntil 5-6 måneder 		

Tabell 2.6. Platemedium med serum til korncellekulturer

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeaktivert hesteserum	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
Insulin (1 mM)	50 µl	100 nM
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM
• Sterilfiltreres (0,2 µm)		

Tabell 2.7. Mengde cellesuspensjon per skål

Skål	Størrelse	Mengde
Liten	8,8 cm ²	1 ml
Medium	21,5 cm ²	3,3 ml
Stor	66,5 cm ²	10 ml

2.2.4 Tilsetting av ernæringsmedium med Ara-C til korncellekulturer

Cytosin β-arabino-furanoside (Ara-C) kan tilsettes cellekulturene 16-20 timer etter preparering for å hindre vekst av ikke-nevronale celler. Platemedium med serum byttes ut med definert ernæringsmedium, samtidig som Ara-C-løsning kan tilsettes.

1. Ara-C-løsning lages (tabell 2.9).
2. Ara-C-løsning tilsettes definert ernæringsmedium (tabell 2.8) i forholdet 1:40, og blandes godt. Platemedium med serum (tabell 2.6) erstattes med definert ernæringsmedium med Ara-C, i de mengder angitt i tabell 2.7.
3. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂.

Tabell 2.8. Definert ernæringsmedium til korncellekulturer

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
Na ₂ SnO ₃ (100 µM)	150 µl	30 nM
T ₃ (20 µg/ml)	17 µl	1 nM
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM
Humant transferrin	50 mg	100 µg/ml
Insulin	12,5 mg	25 µg/ml
Putrescin	4,8 mg	60 µM
<ul style="list-style-type: none"> • Sterilfiltreres (0,2 µm) • Oppbevares ved 2-8 °C 		

Tabell 2.9. 0,41 mM Ara-C-løsning

Komponenter	Mengde
Cytosin β-arabino-furanoside	1 mg
Definert ernæringsmedium til korncellekulturer (tabell 2.8)	10 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Sterilfiltreres (0,2 µm) • Ved utveiling av Ara-C-tørrstoff benyttes støvmaske, hansker og labfrakk • Tilsettes mediet i forholdet 1:40 	

2.3 PC12-celler

PC12-celler er kreftceller hentet fra feokromocytom hos rotte, en svulst som utgår fra binyremargen. PC12-celler syntetiserer og lagrer katekolaminene dopamin og noradrenalin, og likner derfor på nevroner i det sympatiske nervesystemet (Greene og Tischler, 1976). NGF-differensierte PC12-celler uttrykker i tillegg endogen glukokortikoidreseptor (GR), som er viktig for nevronele egenskaper som eksitabilitet og energimetabolisme (Morsink, et al., 2006).

2.3.1 Splitting av PC12-celler til flaske

PC12-cellene dyrkes i 175 cm² cellekulturflasker, og inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO₂. Cellene splittes til nye flakser hver tredje eller fjerde dag.

1. Cellekulturflasken inspiseres i et mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av.
3. 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.10) tilsettes flasken.
4. Flasken bankes på sidene slik at cellene løsner fra bunnen.
5. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger for å bryte opp celleaggregater. Ved behov pipetteres cellesuspensjonen ytterligere opp og ned med en innsnevret pasteurpipette, til celleaggregatene er løst opp.
6. Cellene inspiseres i et lysmikroskop for å sikre at en mest mulig homogen cellesuspensjon er oppnådd.
7. 1,5 ml cellesuspensjon overføres til en ny cellekulturflaske, tilsatt 20 ml nytt PC12-medium. Flasken beveges forsiktig frem og tilbake for å få en jevn fordeling av celler i flasken.

2.3.2 Splitting av PC12-celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-6 ovenfor.
2. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Bürcher tellekammer for å bestemme celletettheten. Cellene telles i et lysmikroskop.
3. 2 rutenett (4 × 4 ruter) telles, ett på hver side av midten av tellekammeret. Gjennomsnittet av de to tellingene brukes.
4. Ønsket celletetthet i skålene er $7,0 \times 10^4$ celler/ml. Følgende formel brukes for å beregne mengde cellesuspensjon som skal brukes:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet per ml}}{\text{Celletetthet i celleduspensjonen} \times 10^4}$$

5. Følgende formel brukes for å beregne mengde medium som skal brukes:

$$Y \text{ (ml)} = (\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - X \text{ (ml)}$$

6. Beregnet mengde celleduspensjon og PC12-medium (tabell 2.10) blandes godt, og overføres til sterile skåler. Mengde celleduspensjon per skål er angitt i tabell 2.7.

7. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂.

Tabell 2.10. PC12-medium med serum

Komponenter	Mengde
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml
Hesteserum	25 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Komponentene tilsettes i LAF-benk • Oppbevares ved 2-8 °C 	

2.3.3 Eksponering av PC12-celler

Tre forsøksoppsett ble satt opp (tabell 2.11-2.13) for morfometrisk analyse i mikroskop, deteksjon av celledød og westernblotting-analyse. Cellene ble eksponert 24 timer etter utplating. Reagenser til bruk i forsøksoppsettene er vist i tabell 2.14.

1. 2 ml medium fra medium skåler eller 6 ml medium fra store skåler pipetteres over i et sterilt 15 ml rør.

2. Reagens(er) til eksponering tilsettes røret, og blandes godt. Mifepriston, RU28318 og caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk tilsettes skålen 15 minutter før andre reagenser tilsettes samme skål.
3. Rester av medium på skålen pipetteres av og hives.
4. Medium tilsatt reagens(er) settes forsiktig på i kanten av skålen.
5. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂.

Tabell 2.11. Første forsøksoppsett for morfometrisk analyse i mikroskop, deteksjon av celledød og westernblotting-analyse av PC12-celler

Behandling
• Ubehandlet
• 10 µM Ara-C
• 1 ‰ EtOH
• 10 µM Ara-C + 1 ‰ EtOH
• 10 µM Dex
• 10 µM Ara-C + 10 µM Dex
• 50 ng/ml NGF

Tabell 2.12. Andre forsøksoppsett for morfometrisk analyse i mikroskop, deteksjon av celledød og westernblotting-analyse av PC12-celler

Behandling
• 10 µM Mifepriston
• 10 µM Mifepriston + 10 µM Dex
• 10 µM Mifepriston + 10 µM NGF
• 10 µM RU28318
• 10 µM RU28318 + 10 µM Dex
• 10 µM RU28318 + 50 ng/ml NGF
• Andre forsøksoppsett ble utført parallellt med første forsøksoppsett hvor EtOH, Dex og NGF inngår.

Tabell 2.13. Tredje forsøksoppsett for morfometrisk analyse i mikroskop, deteksjon av celledød og westernblotting-analyse av PC12-celler

Behandling
<ul style="list-style-type: none"> • 1 μM z-DEVD-cmk • 1 μM z-DEVD-cmk + 1 ‰ EtOH • 1 μM z-DEVD-cmk + 10 μM Dex • 1 μM z-DEVD-cmk + 50 ng/ml NGF • 1 ‰ DMSO • Tredje forsøksoppsett ble utført parallellt med første forsøksoppsett hvor ubehandlet, EtOH, Dex og NGF inngår.

Tabell 2.14. Reagenser til eksponering av PC12-celler

Reagens	Komponenter	Mengde
0,41 mM Ara-C	Cytosin β -arabino-furanoside	1,0 mg
	PC12-medium (tabell 2.10)	10 ml
	• Sterilfiltreres (0,2 μ m)	
	• Tilsettes mediet i forholdet 1:40	
10 mM Dex	Deksametason	39,2 mg
	96 % etanol	10 ml
	• Tilsettes mediet i forholdet 1:1000	
20 μ g/ml NGF	Nervevekstfaktor	10 μ g
	CV ₁ -medium (tabell 2.15)	0,5 ml
	• Tilsettes mediet i forholdet 1:400	
10 mM Mifepriston	Mifepriston	4,4 mg
	96 % etanol	1,0 ml
	• Tilsettes mediet i forholdet 1:1000	
10 mM RU28318	RU28318	4,4 mg
	96 % etanol	1,0 ml
	• Tilsettes mediet i forholdet 1:1000	

Dex-, NGF- mifepriston- og RU28318-løsningen oppbevares ved -20 °C.

Tabell 2.15. CV₁-medium

Komponenter	Mengde
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml
<ul style="list-style-type: none">• Komponentene tilsettes i LAF-benk• Oppbevares ved 2-8 °C	

2.4 Morfometrisk analyse i mikroskop

PC12-celler og korncellekulturer ble platet ut i medium store skåler (21,5 m²) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering. PC12-celler ble studert 24-72 timer etter eksponering. Kornceller ble studert 24-144 timer etter eksponering med eller uten Ara-C. Cellene ble studert og kvantifisert i et Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop. Analysen ble utført på digitaliserte bilder av levende celler tatt under fasekontrast ved 40x forstørrelse. Fasekontrastbilder ble tatt med Nikon Digital Sight DS-U2, et kamera koblet til mikroskopet. Bilder ble analysert ved hjelp av bildeprogrammet NIS-Elements BR fra Nikon.

Morfometrisk analyse ble utført på fem endepunkter ved bruk av visuell telling og manuell måling i et fluorescensmikroskop (figur 2.1). Fire ulike synsfelt i hver skål ble analysert, og områder med spredt fordeling av celler ble valgt for kvantifisering. I disse områdene endrer ikke celletettheten seg over tid (figur 2.2). Dette ble gjort for å ekskludere områder hvor celler ligger svært tett, og hvor det er vanskelig å analysere cellenes nevritter.

1. Celleantall

Totalt antall celler per synsfelt telles, uavhengig av tilstedeværelse av nevritter.

2. Antall celler med nevritter

Totalt antall celler med nevritter telles. Cellene må ha minst én tydelig identifiserbar nevritt. Andel celler med nevritter, av totalt antall celler, beregnes.

3. Antall nevritter per celle

Totalt antall nevritter per celle telles. Kun tydelig identifiserbare nevritter, uavhengig av lengde, telles. Hele nevritten må være synlig i synsfeltet for å bli talt. Gjennomsnittlig antall nevritter per celle, ut i fra totalt antall celler, beregnes.

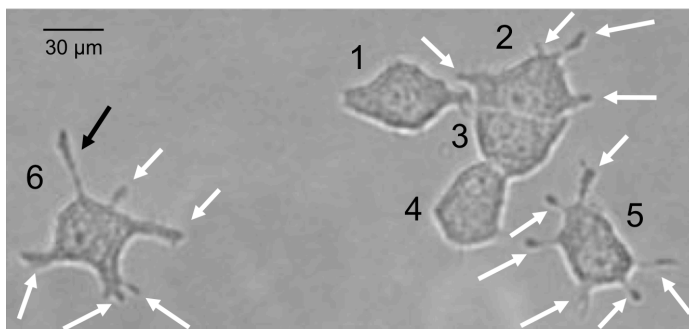
4. Antall lange nevritter

Antall lange nevritter per synsfelt telles. En nevrutt klassifiseres som lang når den er lengre enn en gjennomsnittlig cellediameter. En gjennomsnittlig cellediameter ble målt til 30 μm . Hele nevrittlengden må være synlig i synsfeltet for å bli talt. Andel lange nevritter, av totalt antall nevritter, beregnes.

5. Nevrittlengde per celle

Nevrittlengder per celle, av nevritter klassifisert som lange, måles manuelt og summeres. Hele nevrittlengden må være synlig i synsfeltet for å bli målt. Gjennomsnittlig nevrithlengde per celle, ut i fra totalt antall celler, beregnes.

A)

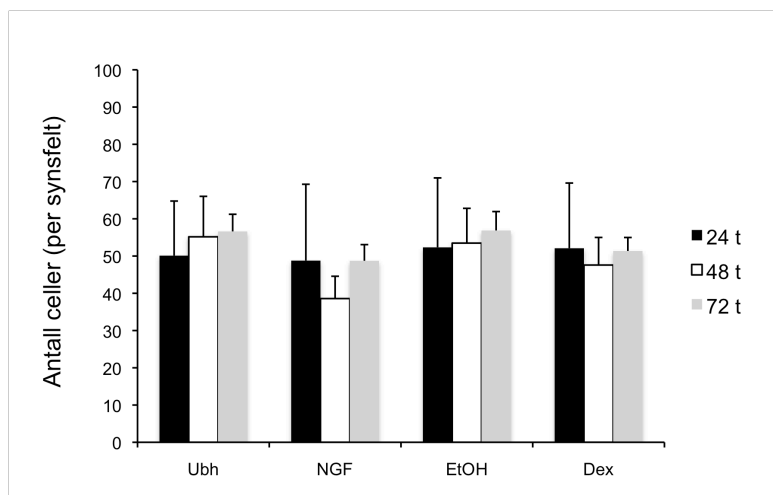


B)

	Celleantall	Antall celler med nevritter	Antall nevritter per celle	Antall lange nevritter	Nevrittlengde per celle
Behandling 1	6	3/6	16/6	1/16	x $\mu\text{m}/6$

Figur 2.1 Morfometrisk analyse av PC12-celler i mikroskop

PC12-celler ble analysert i et mikroskop ved 40x forstørrelse. Totalt antall celler per synsfelt, antall celler med nevritter, antall nevritter per celle, antall lange nevritter per synsfelt og nevrithlengde per celle ble kvantifisert. (A) Celle 1, 3 og 4 har ingen nevritter. Celle 2, 5 og 6 telles som celler med nevritter, og antall nevritter per celle telles (sorte og hvite piler). På celle 6 måles nevrithlengde (sort pil). Bildet er forstørret for å tydeligere vise cellenes nevritter. (B) Tilhørende skjema for Morfometrisk analyse av PC12-celler i mikroskop.



Figur 2.2. Områder med lik celletetthet ble valgt for analyse av nevrutvekst i PC12-celler

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF, og totalt antall celler per synsfelt kvantifisert i et mikroskop 24, 48 og 72 timer etter eksponering. Ubehandlete og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. Figuren viser gjennomsnittlig antall celler per synsfelt fra uavhengige forsøk med SE, n=8-9. Det er ingen forskjeller i antall celler mellom gruppene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 2.2

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	50,1	14,7	9
Ubh	48	55,2	10,9	9
Ubh	72	56,6	4,6	9
NGF	24	48,8	20,5	9
NGF	48	38,6	6,0	9
NGF	72	48,7	4,3	9
EtOH	24	52,3	18,6	9
EtOH	48	53,5	9,3	9
EtOH	72	56,9	5,1	9
Dex	24	52,1	17,5	8
Dex	48	47,6	7,4	9
Dex	72	51,4	3,6	9

2.5 Deteksjon av celledød i PC12-celler

Trypanblå er et fargestoff som brukes for å selektivt farge døde celler. Metoden ble introdusert av Pappenheimer i 1917, og er basert på at trypanblå penetrerer cellemembranen til døde celler og gjør dem blå. Levende celler har intakte cellemembraner og forblir ufarget. Ved bruk av et mikroskop kan antall døde og levende celler telles. PC12-celler ble platet ut i medium store skåler (21,5 m²) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering. 24-72 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og antall døde celler kvantifisert i et lysmikroskop. Fire ulike synsfelt i hver skål ble analysert, og prosent celledød beregnet. Kvantifisering av celledød ble utført på de tre forsøksoppsettene vist i tabell 2.11- 2.13.

Prosedyre for farging med trypanblå

1. Trypanblå-stockløsning 2 % (tabell 2.16) og NaCl-stockløsning 1,8 % (tabell 2.16) blandes i forholdet 1:1. Det lages et volum som er passende til antall skåler som skal telles.
2. Mediet i skålene justeres til 1 ml.
3. Hver skål tilsettes 250 µl nylaget trypanblå fargeløsning. Skålene beveges forsiktig rundt slik at fargeløsningen blandes jevnt i mediet.
4. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂ i 30 minutter.
5. Fargeløsningen i skålen som skal telles helles av. Antall blå celler (døde) og antall hvite celler (levende) telles hver for seg. Andel døde celler, av totalt antall celler, beregnes.

Tabell 2.16. Løsninger til farging med trypanblå

Løsning	Komponent	Mengde
Trypanblå-stockløsning 2 %	Trypanblå	1 g
	MQ-vann	50 ml
	<ul style="list-style-type: none">• Komponentene blandes og varmes opp til kokepunktet under avtrekk. Avkjøles i romtemperatur og filtreres.• Oppbevares i romtemperatur	
NaCl-stockløsning 1,8 %	NaCl	1,8 g
	MQ-vann	100 ml
	<ul style="list-style-type: none">• Oppbevares i romtemperatur	

2.6 Westernblotting

Westernblotting er en teknikk brukt for å identifisere og kvantifisere proteiner basert på deres egenskap til å binde spesifikke antistoffer. Teknikken gjør det mulig å analysere celleekstrakter eller homogeniserte vevsprøver. SDS-polyakrylamidgel elektroforese (SDS-PAGE) separerer proteinene etter størrelse ved tilstedeværelse av en konstant elektrisk spenning (avsnitt 2.6.7). Proteinene overføres fra polyakrylamidgelen til en nitrocellulosemembran i et elektrisk felt (Towbin, et al., 1979) (avsnitt 2.6.8). Denne prosessen kan monitoreres ved bruk av reversibel farging med Ponceaus fargeløsning. Frie bindingssteder på membranen blokkes ved bruk av 5 % tørrmelk i 0,1 % Tween, og hindrer uspesifikk binding av antistoffet (Tovey, et al., 1987) (avsnitt 2.6.9). Etter blokking påsettes ønsket antistoff som identifiseres av et sekundært antistoff, spesifikk for gjenkjennelse av det primære antistoffet (avsnitt 2.6.10). Sekundærantistoffet er konjugert med enzymet pepperrot peroksidase (HRP). I nærvær av hydrogenperoksid oksiderer HRP substratet luminol, og det avgis lys. Generert lys fanges opp av fremkallingsmaskinen (Chemi Genius² Bio Imaging System) som et bånd på membranen, og kan kvantifiseres (avsnitt 2.6.11). Mengde lys er proporsjonalt med mengde protein bundet til membranen.

2.6.1 Westernblotting av proteiner fra PC12-celler

PC12-celler ble splittet ut i store skåler (66,5 m²) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering (se avsnitt 2.3.3). Cellene ble høstet 24 timer etter eksponering. Westernblotting-analyser ble utført på de tre forsøksoppsettene vist i tabell 2.11-2.13.

2.6.2 Westernblotting av proteiner fra korncellekulturer

Korncellekulturer ble platet ut i store skåler (66,5 cm²) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering med eller uten Ara-C (se avsnitt 2.2.4). Cellene ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6.

2.6.3 Høsting av celler til westernblotting

1. 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere lages (tabell 2.17). Det lages en tilstrekkelig mengde til antall skåler som skal høstes.
2. Mediet helles av skålene, og rester pipetteres av.
3. Skålene vaskes to ganger med 3 ml kald PBS (tabell 2.18). Rester etter siste vasking pipetteres av.
4. 100 µl 2 % SDS tilsatt fosfatase- og proteasehemmere pipetteres over i skålen. Cellene skrapes løs med en celskrape. Først skrapes det over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
5. Cellesuspensjonen overføres til eppendorfrør, og settes på is.
6. Prøvene kokes ved 95 °C i 2 minutter og fryses ved -20 eller -70 °C frem til bruk.

Tabell 2.17. 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Leupeptin (5 mg/ml)	1 µl	5 µg/ml
PMSF (100 mM)	3 µl	0,3 mM
Pepstatin A (1 mg/ml)	5 µl	5 µg/ml
Na ₃ VO ₄ (10 mM)	10 µl	0,1 mM
20 % SDS	100 µl	2 %
PBS (tabell 2.18)	ad 1 ml	

Tabell 2.18. Fosfatbufret saltvann (PBS)

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
NaCl	32,0 g	137 mM
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	7,12 g	12,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,08 g	2,0 mM
KCl	0,8 g	2,7 mM
MQ-vann	ad 4000 ml	
<ul style="list-style-type: none"> • pH justeres til 7,4 med HCl/NaOH • Autoklaveres • Oppbevares ved 2-8 °C 		

2.6.4 Proteinmåling

Før westernblotting kan utføres, må proteinkonsentrasjon i hver celleprøve bestemmes og korrigeres for. Proteininnholdet i hver celleprøve bestemmes ved hjelp av BCATM Protein Assay Kit. Utstyret består av reagens A, reagens B og bovint serumalbumin standard (2 mg/ml).

Prosedyre for måling av relativ proteinmengde

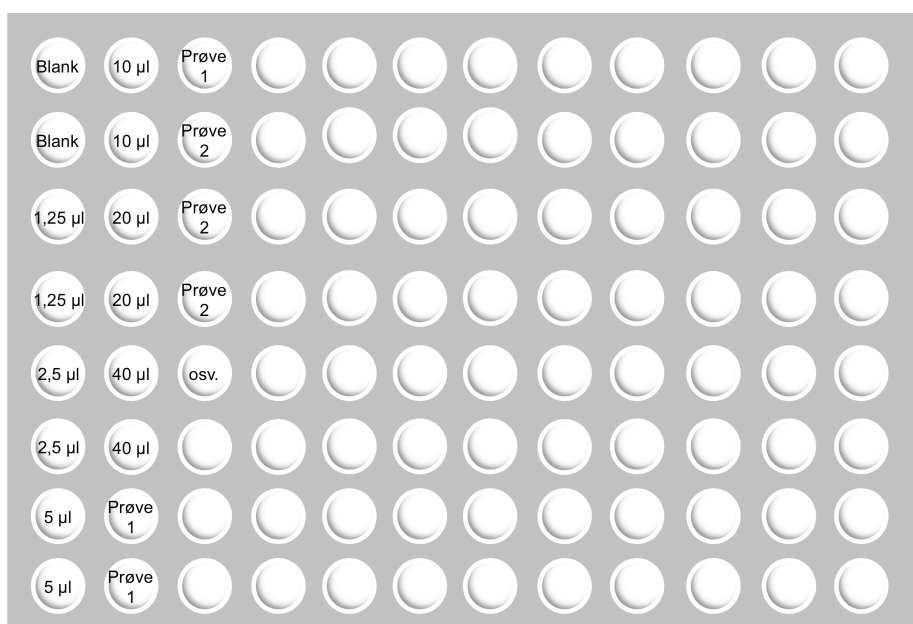
1. Working reagent (tabell 2.19) og fortynnet standardløsning (tabell 2.19) lages.
2. Fortynnet standardløsning tilsettes 12 brønner i et blankt 96-brønners brett til sluttmengder på 0, 0,83, 1,66, 3,33, 6,66, 13,33 og 26,66 µg. Mengde fortynnet standard per brønn er vist i plateoppsettet (figur 2.3).

3. 200 µg working reagent tilsettes alle brønnene som skal brukes.
4. Celleprøver hentes fra fryseren (-20 eller -70 °C), og tines i et vannbad i 1-2 minutter før bruk. Prøvene blandes godt på en elektrisk minishaker.
5. 10 µl celleprøve tilsettes i loddrette rader etter standardprøvene på 96-brønners brettet. Hver celleprøve tilsettes tre brønner.
6. 96-brønners brettet inkuberes ved 37 °C i 1 time.
7. Absorbansen måles ved 570 nm i en plateleser.
8. Relativ proteinmengde i hver celleprøve regnes ut.

Tabell 2.19. Løsninger til proteinmåling

Løsning	Komponenter	Mengde
Standardløsning	Bovint serumalbumin (BSA) 2 mg/ml	50 µl
	PBS (tabell 2.18)	100 µl
Working reagent	Reagent A	50 deler
	Reagent B	1 del

Figur 2.3. Plateoppsett for proteinmåling



2.6.5 Proteinjustering av prøver

1. Prøvene blandes med 4X Laemmlibuffer (tabell 2.20) i forholdet 3:1. 2-Mercaptoetanol tilsettes 4X Laemmlibufferen rett før bruk.
2. Det skal settes på 50 µg prøve. Volumene justeres til 45 µl med 1X Laemmlibuffer til fortynning (tabell 2.21), slik at proteinkonsentrasjonen blir lik i hver prøveløsning som skal påsettes gelen. 1X Laemmlibuffer til fortynning brukes sammen med 4X Laemmlibuffer, og inneholder derfor ikke 2-mercaptoetanol.

Tabell 2.20. 4X Laemmlibuffer

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
SDS (20 %)	4,0 ml	2 %
Glyserol (85 %)	2,35 ml	5 %
2-mercaptoetanol	2,0 ml	5 %
MQ-vann	0,9 ml	
Tris-HCl (4 M) pH 6,8	0,75 ml	75 mM
Noen korn bromfenolblått		
• 2-mercaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk		

Tabell 2.21. 1X Laemmlibuffer til fortynning

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
MQ-vann	5,5 ml	
SDS (10 %)	2,0 ml	2 %
Tris-HCl (0,5 M) pH 6,8	1,5 ml	75 mM
Glyserol (50 %)	1,0 ml	5 %
Noen korn bromfenolblått		
• Bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk		

2.6.6 Støping av gel

1. Ytterglass og dekkglass vaskes med 70 % etanol for å fjerne eventuelle fettrester. Støpeformen settes sammen (tykk + tynn glassplate, grønt stativ + gummilist). Glassplatene plasseres i støpeformen.
2. Komponenter til separerende gel (tabell 2.22) av ønsket polyakrylamid konsentrasjon blandes, og helles i spalten mellom glassplatene. Polyakrylamidgelens konsentrasjon bestemmes ut i fra molekylvekten til proteinene som blir forsøkt detektert (tabell 2.24).
3. MQ-vann tilsettes på toppen av separerende gel, for å sikre at gelen får en jevn overflate.
4. La stå i 30 minutter for at gelen skal polymerisere.
5. MQ-vannet helles av, og rester suges av med et cellepapir.
6. Komponenter til stacking gel (tabell 2.22) blandes, og helles over separerende gel.
7. En kam med antall tagger som er tilpasset antall prøver som skal påsettes, settes forsiktig ned i gelen.
8. La stå i 30 minutter for at gelen skal polymerisere.

Tabell 2.22. Gelløsninger

Gelløsning	Komponenter	Mengde
Separerende gel	MQ-vann	5,5 ml
Polyakrylamidgel 6 %, 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.23)	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	2,0 ml
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	8 µl
Separerende gel	MQ-vann	4,6 ml
Polyakrylamidgel, 8 %, 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.23)	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	2,7 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	6 µl
Separerende gel	MQ-vann	4,0 ml
Polyakrylamidgel, 10 %, 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.23)	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	3,3 ml
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	4 µl
Stacking gel	MQ-vann	2,4 ml
	Øvre gelbuffer (tabell 2.23)	1,0 ml
	Akrylamid (30 %)	0,6 ml
	APS (10 %)	20 µl
	TEMED	4 µl
<ul style="list-style-type: none">• Gelstøping utføres i avtrekk med vernebriller, hansker og labfrakk.• TEMED tilsettes gelløsningen sist.		

Tabell 2.23. Løsninger til bruk i gelstøping

Løsning	Komponenter	Mengde
Øvre gelbuffer	Tris-base	18,17 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH	
Nedre gelbuffer	Tris-base	6,06 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH	

Tabell 2.24. Valg av polyakrylamidgel-konsentrasjon

Proteinets størrelse (kDa)	% Polyakrylamidgel
4-40	20
12-45	15
10-70	12,5
15-100	10
25-200	8

Tabellen er hentet fra Abcams nettside, www.abcam.com/technical.

2.6.7 Gelelektroforese

1. Glassplatene fjernes fra støpeformen, og vaskes på utsiden med vann for å fjerne eventuelt søl. Kammen tas forsiktig ut av gelen.
2. Glassplatene plasseres i et kar for gelkjøring, med den tynne glassplaten vendt inn mot midten. Karet består av et indre og et ytre rom, som fylles med elfobuffer (tabell 2.25). Luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
3. En gul påføringsapplikator settes over gelen, og 5 µl standard (Precision Plus Protein Dual Color Standard) påsettes forsiktig første brønn.
4. De proteinjusterte prøvene tilsatt Laemmlibuffer kokes i 5 minutter ved 95 °C.
5. 40 µl prøve påsettes forsiktig i hver brønn.

6. Strøm kobles til karet. Prøvene kjøres først gjennom separerende gel på 90 V i 15 minutter, og deretter gjennom stacking gel på 150 V i ca. 1 time.

Tabell 2.25. Elfobuffer

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon	
10X TGS	100 ml	Tris	25 mM
Destillert vann	900 ml	Glycin	192 mM
• pH 8,3		SDS	0,1 % (v/v)

2.6.8 Blotting av gel

1. En membran, to skrubber og to filterpapir fuktes i blottebuffer (tabell 2.26).
2. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten ved hjelp av en plastspatel. Stacking gel skjæres av og hives.
3. Gelen overføres fra den tynne glassplaten til et fuktet filterpapir ved hjelp av en plastspatel.
4. Gelen pakkes i følgende rekkefølge:
 - Gelbeholderens sorte side
 - Skrubbb
 - Filterpapir som er festet til gelen
 - Membran
 - Filterpapir
 - Skrubbb
 - Gelbeholderens hvite side
5. Luftbobler mellom gel og membran fjernes ved hjelp av en stor plastspiss, som rulles fra midten av membranen og i alle retninger.

6. Gelbeholderen lukkes, og settes i et blottekar med gelbeholderens sorte side vendt inn mot det sorte i karet.
7. Magnettrører og iskassett plasseres i blottekaret. Blotteoppsatsen settes kjølig på en magnettrører.
8. Blottekaret fylles opp med blottebuffer slik at gelpakken dekkes, og blottes ved 50 mA over natt eller ved 400 mA i 1 ½ time.

Tabell 2.26. Blottebuffer

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon	
10X TG	100 ml	Tris	25 mM
Metanol	200 ml	Glycin	192 mM
Destillert vann	700 ml	Metanol	20 %
• pH 8,3			

2.6.9 Ponceaus farging og blokking av membran

1. For å sikre at proteinene er overført fra gel til membran på en tilfredsstillende måte, farges membranen med Ponceaus fargeløsning i 1 minutt, slik at proteinbåndene farges.
2. Overflødig fargeløsning fjernes ved å vaske membranen tre ganger i destillert vann.
3. Membranen legges i en plastlomme, og det tas bilde av proteinbåndene i en kopimaskin.
4. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
5. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.27) tilsettes røret, og legges til rulling i romtemperatur i 2-3 timer eller ved 2-8 °C over natt.

Tabell 2.27. Blokkeløsning

Komponenter	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.28)	50 ml
• Oppbevares ved 2-8 °C	

Tabell 2.28. Trisbuffret saltvann med Tween

Løsning	Komponenter	Mengde
10X TBS med 1% Tween	Tris base	24,2 g
	NaCl	80 g
	Tween 20	10,0 ml
	MQ-vann	ad 1000 ml
	<ul style="list-style-type: none"> • Justeres til pH 7,6 med HCl/ NaOH • Oppbevares ved 2-8 °C 	
1X TBS med 0,1 % Tween	10X TBS med 1 % Tween (tabell 2.28)	1 del
	Destillert vann	9 deler
	• Oppbevares ved 2-8 °C	

2.6.10 Tilsetting av primære og sekundære antistoff

1. Blokkeløsningen helles av, og 3 ml ny blokkeløsning (tabell 2.27) tilsettes røret.
2. Primærantistoff tilsettes røret i ulike blandingsforhold avhengig av type antistoff (tabell 2.29). Røret legges til rulling ved 2-8 °C til neste dag.
3. Primærantistoff-blokkeløsningen helles av, og kan brukes om igjen til neste membran. Membranen vaskes tre ganger med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.28) i romtemperatur.
4. 3 ml blokkeløsning tilsettes røret.
5. Sekundærantistoff (tabell 2.30) tilsettes røret i forholdet 1:10 000. Røret legges til rulling i romtemperatur i 2 timer, eller ved 2-8 °C over natt.

6. Sekundærantistoff-blokkeløsningen helles av, og membranen vaskes tre ganger med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween i romtemperatur.

Tabell 2.29. Primære antistoffer brukt til westernblotting

Primærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
Anti-NeuN, clone A60 MAP377	1:200	LV1634819	Millipore
		LV1746157	Millipore
		LV1616015	Millipore
α Tubulin (B-7) sc-5286	1:200	D2310	Santa Cruz Biotechnologies
Anti- β -Actin, clone AC-74 A 5316	1:1000	128K4805	Sigma-Aldrich
Lamin A/C 2032	1:1000	3	Cell Signaling
Anti-PCNA, clone PC10 M0879	1:200	59333	Dako
Anti-Caspase-3 Rabbit pAb 235412	1:2000	D00060132	Merck
Anti-PAX6 AB2237	1:2000	JBC1787315	Millipore
NMDA ϵ 1 (NR2A) (C-17) sc-1468	1:100	B1207	Santa Cruz Biotechnologies
NMDA ϵ 2 (NR2B) (C-20) sc-1469	1:100	C0606	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-MAP2A, 2B MAB378	1:500	LV1657471	Millipore

Tabell 2.30. Sekundære antistoffer brukt til westernblotting

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
Goat anti-mouse HRP	1:10 000	IA110692	Thermo Scientific Pierce
Donkey anti-rabbit IgG-HRP sc-2313	1:10 000	C2609	Santa Cruz Biotechnologies
Donkey anti-goat IgG-HRP sc-2020	1:10 000	A1207	Santa Cruz Biotechnologies

2.6.11 Fremkalling

1. Til fremkalling brukes SupersignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate i forsøk med α tubulin, β -aktin og Pax 6. SupersignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate brukes til de andre antistoffene i tabell 2.29. Fremkallingsvæskene består av reagens A og reagens B, som blandes i forholdet 1:1.
2. Membranen tas ut av plastrøret, og overflødig væske får renne av.
3. 1 ml ferdigblandet fremkallingsvæske pipetteres over på en glassflate, og membranen legges over med proteinsiden vendt ned mot glassplaten. La stå i 5 minutter.
4. Overflødig fremkallingsvæske får renne av, og membranen legges i en plastlomme. Luftbobler fjernes ved å gni forsiktig på plastlommen.
5. Membranen fremkalles i Chemi Genius² fra Bio Imaging System (fremkallingsmaskin) med fremkallingsprogrammet Genesnap fra SynGene.
6. Etter fremkalling oppbevares membranen i 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.28) ved 2-8 °C, frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

2.6.12 Stripping av membran

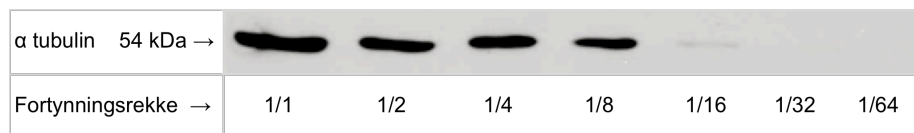
1. TBS med Tween helles av. Plastrøret tilsettes 5 ml Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer, og legges til rulling i romtemperatur i 15 minutter.
2. Strippebufferen helles av, og membranen vaskes tre ganger i 15 minutter med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.28) i romtemperatur.
3. Membranen blokkes med 5 ml blokkeløsning (tabell 2.27) i romtemperatur i 2-3 timer, eller ved 2-8 °C over natt.
4. Videre prosedyre for tilsetning av nytt primærantistoff utføres som beskrevet tidligere.

2.6.13 Måling av westernbåndstyrke

Etter fremkalling av membranen måles styrken til proteinbåndene i antall piksler, ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Det tegnes en ramme rundt hvert enkelt bånd, og antall piksler i hver ramme måles maskinelt. Arealet på rammen holdes konstant for hver måling. Bakgrunnen måles i området rett under hvert enkelt bånd. Båndstyrken oppgis som en gjennomsnitt- og en maks-verdi i ImageJ. For å finne målemetoden som gir en mest lineær sammenheng mellom proteinkonsentrasjon og antall piksler, ble det utført et testforsøk med en tofolds fortynningsrekke av ubehandlede PC12-celler. Prøvene ble kjørt gjennom en 10 % polyakrylamidgel, og primærantistoff mot α tubulin påsatt. Bildet av α tubulin-båndet (figur 2.4) ble analysert i ImageJ. Følgende to verdier ble brukt for å kvantifisere båndstyrken:

- Maksimalt antall piksler – antall piksler i bakgrunnen
- Gjennomsnittlig antall piksler – antall piksler i bakgrunnen

Hver målemetode ble utført tre ganger før regresjonslinje og den multiple korrelasjonskoeffisienten, R^2 , ble beregnet for hver enkelt metode. Sammenligning av metodene ble utført på bakgrunn av gjennomsnittlig R^2 -verdi og \pm SE for R^2 -verdiene (tabell 2.31).



Figur 2.4. α tubulin-bånd fra PC12-celler i syv løsninger med ulik konsentrasjon av proteinet. En tofolds fortynningsrekke med totalt syv ulike proteinkonsentrasjoner av ubehandlede PC12-celler ble laget. Figuren viser α tubulin-båndet for de syv prøvene i fortynningsrekken.

Tabell 2.31. Resultater fra utprøving av metode for måling av båndstyrke

	Gjennomsnittlig verdi	Maksimal verdi
Gjennomsnittlig R^2	0,82	0,81
Standardfeil, SE	0,0202	0,0004

Resultatene viser at måling av gjennomsnittlig og maksimalt antall piksler gir en R^2 -verdi som er tilnærmet lik (tabell 2.31). Bruk av maksimalt antall piksler gir lavest standardfeil. Målemetoden brukt til å måle styrken til proteinbåndene i westernblotting blir derfor bestemt ut i fra hvilken av metodene som samsvarer best med hva båndene viser visuelt.

2.7 Caspase-assay

PC12-celler ble splittet ut i medium skåler ($21,5 \text{ cm}^2$) med en celletetthet på $7,0 \times 10^4$ celler/ml (se avsnitt 2.3.2). Etter 24 timer ble reagenser til eksponering (tabell 2.32) tilsatt skålene (se avsnitt 2.3.3). 4, 24, 48 og 72 timer etter eksponering ble cellene høstet. Cellelysaten ble inkubert ved 37°C i 0,5, 3 og 24 timer, før fluorescens ble målt i en plateleser ved 485/535 nm. Proteinkonsentrasjon i cellelysaten ble målt og korrigert for i fluorescensmålingene.

Tabell 2.32. Eksponeringer ved måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler

-
- Ubehandlet
 - Ubehandlet
 - 1 μ M z-DEVD-cmk
 - 1 ‰ EtOH
 - 1 μ M z-DEVD-cmk + 1 ‰ EtOH
 - 10 μ M Dex
 - 1 μ M z-DEVD-cmk + 10 μ M Dex
 - 50 ng/ml NGF
 - 1 μ M z-DEVD-cmk + 50 ng/ml NGF
-

2.7.1 Høsting av celler til caspase-assay

1. Gammelt medium helles av. Skålene vaskes med 3 ml kald PBS (tabell 2.18), og rester pipetteres av.
2. 500 μ l 1X RIPA (tabell 2.33) tilsettes hver skål, og skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
3. Cellene skrapes løs med en celleskraper. Det skrapes over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
4. Cellesuspensjonen overføres til eppendorfrør, og settes på is.

Tabell 2.33. 1X RIPA

Komponenter	Mengde
Tris-HCl (1 M) pH 7,4	5 ml
Igepal CA-630	1 ml
Natrium deoxycholat monohydrat	0,25 g
EGTA (1 mM)	1 ml
NaCl-løsning (1 M) (tabell 2.34)	3 ml
MQ-vann	ad 100 ml

Tabell 2.34. 1M NaCl-løsning

Komponenter	Mengde
NaCl	146,1 g
MQ-vann	ad 500 ml
• Autoklaveres	

2.7.2 Måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler

1. 100 μ l 1X RIPA (tabell 2.33) tilsatt 20 μ M fluorescerende caspase-3 substrat (DEVD)₂-R110 tilsettes fire brønner i et sort 96-brønners brett.
2. Den neste brønneren tilsettes 100 μ l 1X RIPA tilsatt 20 μ M caspase-3-substrat (DEVD)₂-R110 + 1 μ M caspase-3-hemmer z-DEVD-cmk (negativ kontroll).
3. 100 μ l cellelysats fra første celleprøve tilsettes de fire første brønnene i 96-brønners brettet, som vist i plateoppsettet (tabell 2.35). Resten av celleprøvene settes av på lignende måte.
4. 96-brønners brettet inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂, og fluorescens avleses i en plateleser ved 485/535 nm etter 30 minutter, 4 timer og 24 timer. Luftbobler fjernes med en kanyle før avlesning.
5. Målt fluorescens i brønneren tilsatt både caspase-3-substrat og caspase-3-hemmer brukes som bakgrunn, og trekkes fra gjennomsnittsmålingen til de tre brønnene kun tilsatt caspase-3-substrat. Det har tidligere blitt vist at z-DEVD-cmk reduserer fluorescensmålingen av (DEVD)₂-R110 med minst 85 % (Aziz, *et al.*, 2010).
6. Rester av cellelysater brukes til proteinmåling (se avsnitt 2.6.4). Målt fluorescens korrigeres for mengde protein i hver celleprøve.

Tabell 2.35. Plateoppsett

Brønn	Prøve	Løsning
A1-A3	Ubehandlet	S
A4	Ubehandlet	S+H
B1-B3	Ubehandlet	S
B4	Ubehandlet	S+H
C1-C3	1 µM z-DEVD-cmk	S
C4	1 µM z-DEVD-cmk	S+H
D1-D3	1 ‰ EtOH	S
D4	1 ‰ EtOH	S+H
E1-E3	1 µM z-DEVD-cmk + 1 ‰ EtOH	S
E4	1 µM z-DEVD-cmk + 1 ‰ EtOH	S+H
F1-F3	10 µM Dex	S
F4	10 µM Dex	S+H
G1-G3	1 µM z-DEVD-cmk + 10 µM Dex	S
G4	1 µM z-DEVD-cmk + 10 µM Dex	S+H
H1-H3	50 ng/ml NGF	S
H4	50 ng/ml NGF	S+H
A5-A7	1 µM z-DEVD-cmk + 50 ng/ml NGF	S
A8	1 µM z-DEVD-cmk + 50 ng/ml NGF	S+H

S=Caspase-3 substratet (DEVD)2-R110

H=Caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk

2.8 Grafer og statistikk

Resultatene er fremstilt ved hjelp av Microsoft® Excel® 2008 for Mac. Alle figurer er basert på gjennomsnittet av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE). Til statistisk analyse av resultatene ble SigmaStat versjon 3.0 fra SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA benyttet. Parvis sammenligning av normalfordelte data ble utført ved hjelp av t-test, mens Mann-Whitney Rank Sum Test ble benyttet til å sammenligne to ikke-normalfordelte datasett. For sammenligning av flere grupper hvor dataene var normalfordelte, ble One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Dunnetts' post hoc test benyttet. Ved ikke-normalfordelte datasett ble Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test benyttet. En p-verdi på $<0,05$ ble ansett som signifikant.

3. Resultater

Effekter av Dex, NGF og Ara-C på nevrittutvekst i PC12-celler ble studert, ved å analysere fire ulike endepunkter. Molekylære mekanismer bak effekter av Dex på nevrittutvekst ble videre studert ved bruk av GR antagonist mifepriston og MR antagonist RU28318 (3.1).

Et caspase-assay ble utført for å undersøke om Dex og NGF aktiverte caspase-3. Videre ble det undersøkt om caspase-3 spiller en rolle for mekanismer bak nevrittutvekst induert av Dex og NGF. Dette ble utført ved bruk av caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk (3.2).

Westernblotting-analyser med PCNA som markør ble utført for å studere effekter av Dex, NGF og Ara-C på celleproliferasjon (3.3).

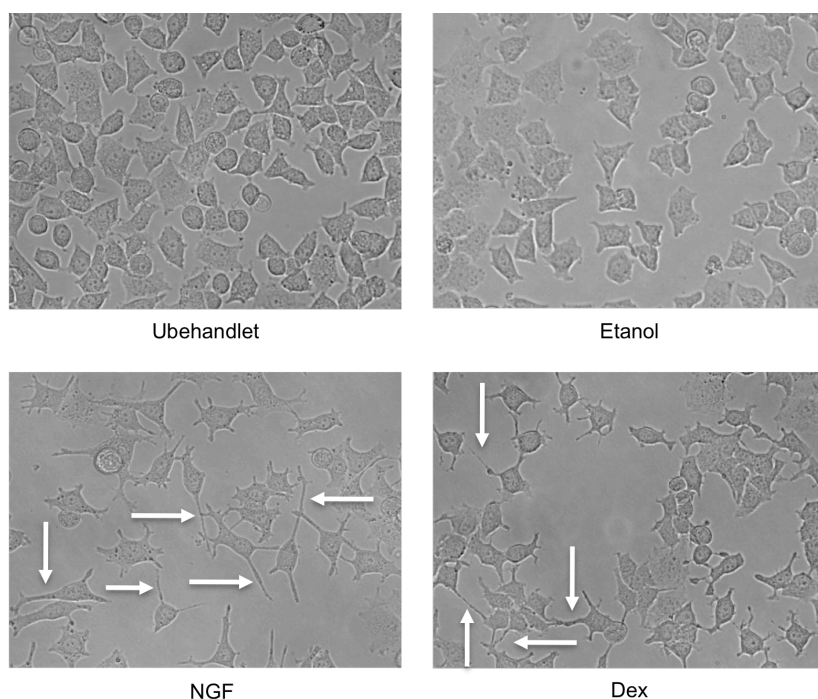
I korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling ble nevrittutvekst over tid studert (3.4). Westernblotting-analyser med PCNA, NeuN, Pax 6, NR2A og NR2B som markører ble utført for å studere cellenes deling, differensiering, migrering og modning over tid. Korncellekulturer ble behandlet med og uten Ara-C, for å undersøke om den antimitotiske forbindelsen hadde effekter på uttrykket av disse markørene (3.5).

3.1 Nevrittutvekst i PC12-celler

PC12-celler ble studert i et Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop, ved bruk av visuell telling og manuell måling. Analyser ble utført 24-72 timer etter eksponering, på digitaliserte bilder tatt under fasekontrast med 40x forstørrelse. Dex, mifepriston og RU28318 ble løst i etanol til en sluttkonsentrasjon på 1 %. Alle kontrollskåler benyttet for celler eksponert for minst én av disse reagensene ble derfor tilsatt tilsvarende volum etanol. Celler ble karakterisert som "celler med nevritter" hvis de hadde minst én tydelig identifiserbar nevritt. Nevritter ble karakterisert som lange hvis de var lengre enn en gjennomsnittlig cellediameter. En gjennomsnittlig cellediameter ble målt til 30 µm (resultater ikke vist). Etter at cellenes nevritter var studert i mikroskop, ble cellene farget med trypanblå og celledøden kvantifisert. Dette ble gjort for å kontrollere om behandlingene gav celledød.

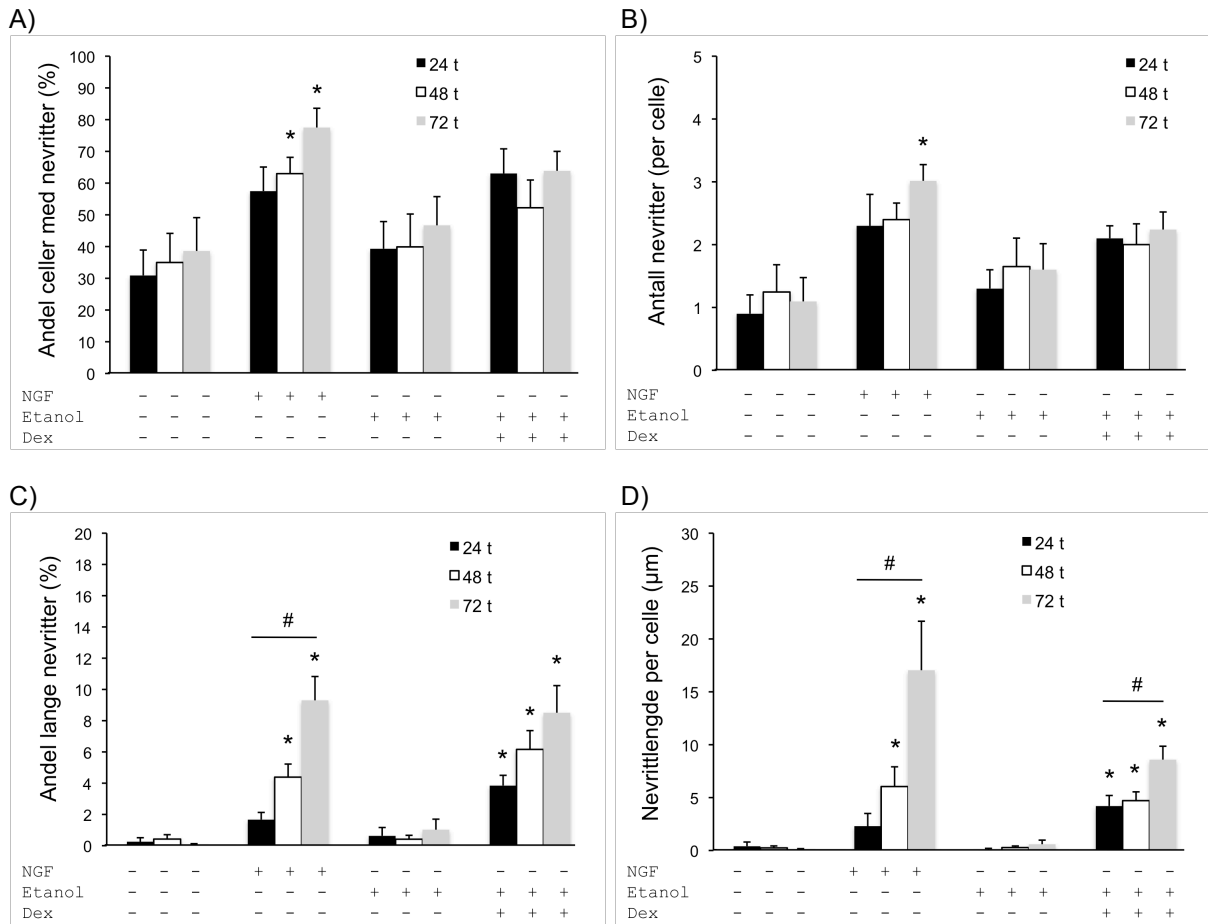
3.1.1 Effekter av Dex og NGF på nevrittutvekst og celledød i PC12-celler

Det har tidligere blitt vist at Dex påvirker nevronale utviklingsprosesser som proliferasjon, vekst og nevrittutvekst i PC12-celler (Jameson, *et al.*, 2006). NGF har en kjent vekstfremmende effekt på PC12-celler, og NGF-eksponerte celler ble brukt som positiv kontroll. Det var ønskelig å karakterisere Dex sine effekter på nevrittutvekst i PC12-celler, og sammenligne disse med effekter av NGF. PC12-celler ble eksponert for Dex (10 μ M) eller NGF (50 ng/ml), og inkubert i 24-72 timer før analyse i mikroskop. Ubehandlete og etanoleksponerte celler ble brukt som kontroller. Fasekontrastbilder tatt 72 timer etter eksponering er vist i figur 3.1. Celler eksponert for NGF gav en tidsavhengig økning i alle endepunktene sammenlignet med ubehandlet kontroll, med flere nevritter (figur 3.2 A og B) og økte nevrittlengder (figur 3.2 C og D). Dex gav ikke flere nevritter sammenlignet med etanolkontroll (figur 3.2 A og B), men gav en tidsavhengig økning av nevrittlengder (figur 3.2 C og D). Sammenlignet med Dex, gav NGF lengre nevritter over tid (figur 3.2 D). Dex og NGF induserte ikke celledød i PC12-celler (figur 3.3). Basaldøden var økende over tid, men var likevel lav. Dex gav ikke økt celledød over tid.



Figur 3.1. Effekter av Dex og NGF på nevrittutvekst i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF. Ubehandlete og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. Fasekontrastbilder er tatt med 40x forstørrelse 72 timer etter eksponering. Pilene peker på eksempler på celler med lange nevritter.



Figur 3.2. Dex og NGF gir økte nevrittelengder i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 10 µM Dex eller 50 ng/ml NGF, og studert i et mikroskop 24, 48 og 72 timer etter eksponering. Ubehandlede og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. (A) Andel celler med nevritter av totalt antall celler, n=8-9. *p<0,05 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (B) Antall nevritter per celle, n=6-7. *p<0,05 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (C) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, n=6-7. *p<0,05 sammenlignet med henholdsvis ubehandlet og etanolkontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. #p<0,05 mellom celler eksponert for NGF i 24 og 72 timer, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (D) Nevrittlengde per celle, n=6-7. *p<0,05 sammenlignet med henholdsvis ubehandlet og etanolkontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. #p<0,05 mellom celler eksponert for NGF i 24 og 72 timer; mellom celler eksponert for Dex i 24 og 72 timer. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk med SE.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 A

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	30,9	8,0	9
Ubh	48	35,0	9,2	9
Ubh	72	38,6	10,5	9
NGF	24	57,5	7,6	9
NGF	48	63,0	5,1	9
NGF	72	77,5	6,1	9
EtOH	24	39,3	8,6	9
EtOH	48	39,9	10,4	9
EtOH	72	46,7	9,0	9
Dex	24	63,0	7,8	8
Dex	48	52,2	8,7	9
Dex	72	63,9	6,1	9

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 B

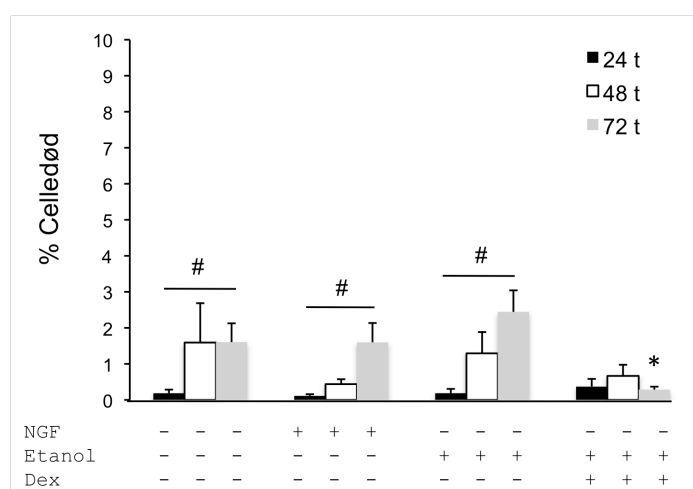
Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,9	0,3	7
Ubh	48	1,2	0,4	7
Ubh	72	1,1	0,4	7
NGF	24	2,3	0,5	7
NGF	48	2,4	0,3	7
NGF	72	3,0	0,3	7
EtOH	24	1,3	0,3	7
EtOH	48	1,7	0,5	7
EtOH	72	1,6	0,4	7
Dex	24	2,1	0,2	6
Dex	48	2,0	0,3	7
Dex	72	2,2	0,3	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 C

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,3	0,3	7
Ubh	48	0,4	0,3	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
NGF	24	1,7	0,5	7
NGF	48	4,4	0,8	7
NGF	72	9,3	1,5	7
EtOH	24	0,6	0,5	7
EtOH	48	0,4	0,2	7
EtOH	72	1,0	0,7	7
Dex	24	3,8	0,7	6
Dex	48	6,2	1,2	7
Dex	72	8,5	1,7	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 D

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,4	0,4	7
Ubh	48	0,2	0,2	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
NGF	24	2,3	1,2	7
NGF	48	6,0	1,9	7
NGF	72	17,0	4,6	7
EtOH	24	0,1	0,1	7
EtOH	48	0,3	0,1	7
EtOH	72	0,6	0,4	7
Dex	24	4,2	1,0	6
Dex	48	4,7	0,8	7
Dex	72	8,6	1,3	7



Figur 3.3. Dex og NGF påvirker i liten grad celledøden i PC12-celler.

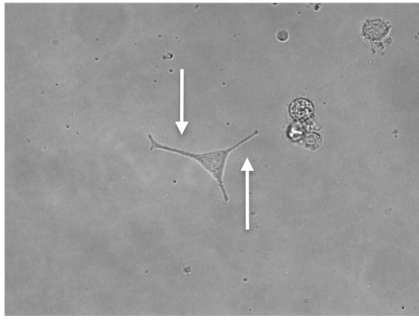
PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF. 24, 48 og 72 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå fargeløsning, og celledøden kvantifisert i et lysmikroskop. Ubehandlede og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. * $p < 0,05$ sammenlignet med etanolkontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. # $p < 0,05$ mellom ubehandlede celler etter 24 og 72 timer; mellom celler eksponert for NGF i 24 og 72 timer; mellom celler eksponert for etanol i 24 og 72 timer. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent i forhold til totalt antall celler fra uavhengige forsøk med SE, $n=7-9$.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,2	0,1	9
Ubh	48	1,6	1,1	8
Ubh	72	1,6	0,5	7
NGF	24	0,1	0,0	9
NGF	48	0,4	0,1	8
NGF	72	1,6	0,5	7
EtOH	24	0,2	0,1	8
EtOH	48	1,3	0,6	8
EtOH	72	2,4	0,6	7
Dex	24	0,4	0,2	9
Dex	48	0,7	0,3	8
Dex	72	0,3	0,1	7

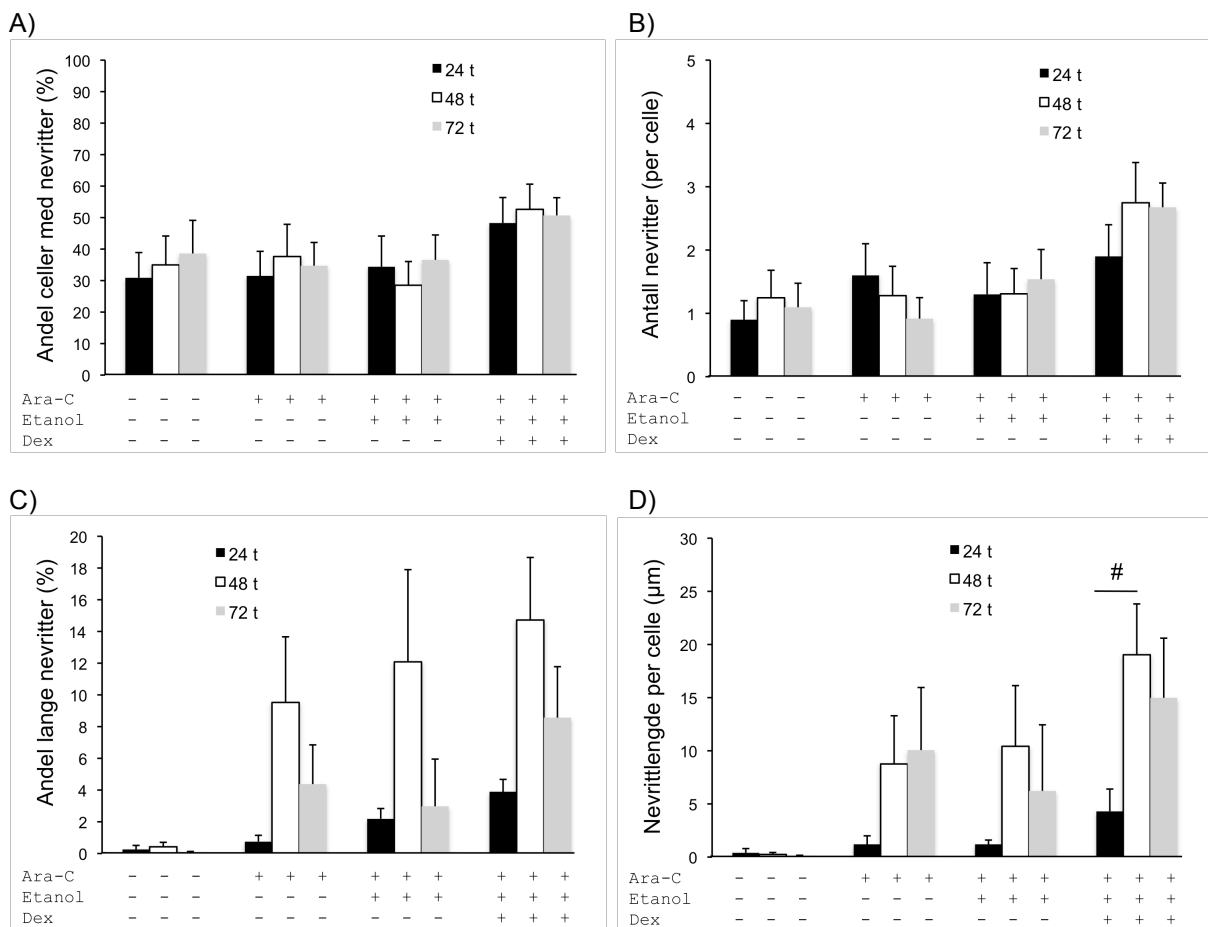
3.1.2 Effekter av Ara-C på nevrutvekst og celledød i PC12-celler

Ara-C er et cytostatikum som hemmer DNA-syntesen, og celler som befinner seg i cellesyklusen blir dermed sterkt påvirket (Dahl, *et al.*, 2009). Ara-C er mye benyttet i korncellekulturer for å hindre deling av astrocytter, og gi kulturer som hovedsakelig består av differensierte nevroner. Dette innebærer at Ara-C kan indusere apoptose, selektare celler som er differensierte eller påvirke cellene slik at de differensierer. Av denne grunn var det ønskelig å studere effekter av Ara-C på nevrutvekst i PC12-celler. Dex hadde en tydelig effekt på nevrutlengder (figur 3.2 C og D), og det var derfor også ønskelig å undersøke om tilsats av Dex til Ara-C-eksponerte celler ville ha noen tilleggseffekt. PC12-celler ble eksponert for Ara-C (10 μ M) eller Ara-C (10 μ M) tilsatt Dex (10 μ M), og inkubert i 24-72 timer før analyse i mikroskop. Ubehandlete celler og celler eksponert for Ara-C tilsatt etanol ble brukt som kontroller. Fasekontrastbilde tatt 72 timer etter eksponering er vist i figur 3.4. Ara-C gav ikke flere nevrut sammenlignet med ubehandlet kontroll (figur 3.5 A og B), men det var en tendens til økte nevrutlengder (figur 3.5 C og D). Tilsats av Dex til Ara-C-behandlede celler hadde ingen tilleggseffekt på noen av endepunktene (figur 3.5). Ara-C gav en tidsavhengig økning i celledød (figur 3.6). Tilsats av Dex gav ingen ytterligere effekt på celledød i Ara-C-eksponerte celler.



Figur 3.4. Effekter av Ara-C på nevritutvekst i PC12.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Ara-C. Fasekontrastbildet er tatt med 40x forstørrelse 72 timer etter eksponering. Pilene peker på lange nevritter. Ubehandlet kontroll er vist i figur 3.1.



Figur 3.5. Ara-C påvirker nevrittlengder i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Ara-C eller 10 μ M Ara-C tilsatt 10 μ M Dex, og studert i et mikroskop 24, 48 og 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler og celler eksponert for Ara-C tilsatt etanol er brukt som kontroll for henholdsvis Ara-C og Ara-C tilsatt Dex. (A) Andel celler med nevritter av totalt antall celler, n=9. (B) Antall nevritter per celle, n=7. (C) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, n=7. (D) Nevrittlengde per celle, n=7. #p<0,05 mellom celler eksponert for Ara-C tilsatt Dex i 24 og 48 timer, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk med SE.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 A

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	30,9	8,0	9
Ubh	48	35,0	9,2	9
Ubh	72	38,6	10,5	9
Ara-C	24	31,5	7,8	9
Ara-C	48	37,6	10,2	9
Ara-C	72	34,7	7,4	9
Ara-C + EtOH	24	34,4	9,8	9
Ara-C + EtOH	48	28,5	7,5	9
Ara-C + EtOH	72	36,6	7,9	9
Ara-C + Dex	24	48,3	8,1	9
Ara-C + Dex	48	52,6	8,0	9
Ara-C + Dex	72	50,7	5,6	9

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 B

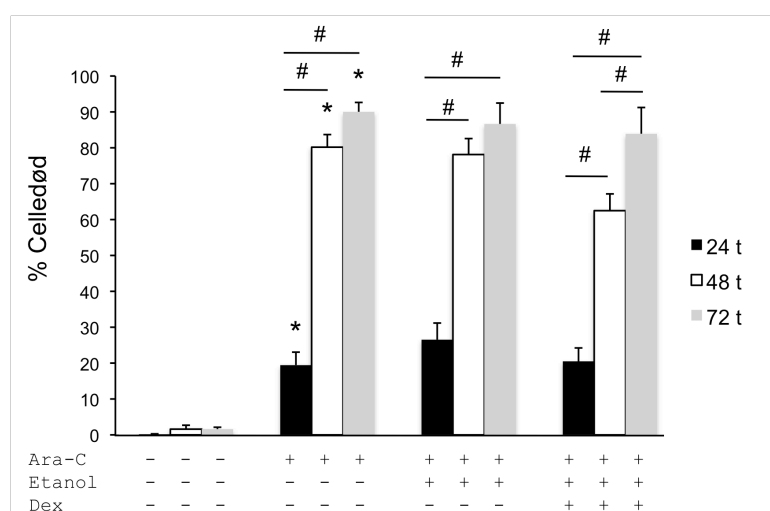
Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,9	0,3	7
Ubh	48	1,2	0,4	7
Ubh	72	1,1	0,4	7
Ara-C	24	1,6	0,5	7
Ara-C	48	1,3	0,5	7
Ara-C	72	0,9	0,3	7
Ara-C + EtOH	24	1,3	0,5	7
Ara-C + EtOH	48	1,3	0,4	7
Ara-C + EtOH	72	1,5	0,5	7
Ara-C + Dex	24	1,9	0,5	7
Ara-C + Dex	48	2,7	0,6	7
Ara-C + Dex	72	2,7	0,4	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 C

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,3	0,3	7
Ubh	48	0,4	0,3	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
Ara-C	24	0,7	0,4	7
Ara-C	48	9,5	4,1	7
Ara-C	72	4,4	2,5	7
Ara-C + EtOH	24	2,2	0,7	7
Ara-C + EtOH	48	12,1	5,8	7
Ara-C + EtOH	72	3,0	3,0	7
Ara-C + Dex	24	3,9	0,8	7
Ara-C + Dex	48	14,7	3,9	7
Ara-C + Dex	72	8,6	3,2	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 D

Eksposering	Eksposerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,4	0,4	7
Ubh	48	0,2	0,2	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
Ara-C	24	1,2	0,8	7
Ara-C	48	8,8	4,5	7
Ara-C	72	10,1	5,9	7
Ara-C + EtOH	24	1,2	0,4	7
Ara-C + EtOH	48	10,4	5,7	7
Ara-C + EtOH	72	6,2	6,2	7
Ara-C + Dex	24	4,3	2,1	7
Ara-C + Dex	48	19,0	4,8	7
Ara-C + Dex	72	15,0	5,6	7



Figur 3.6. Ara-C-indusert celledød i PC12-celler.

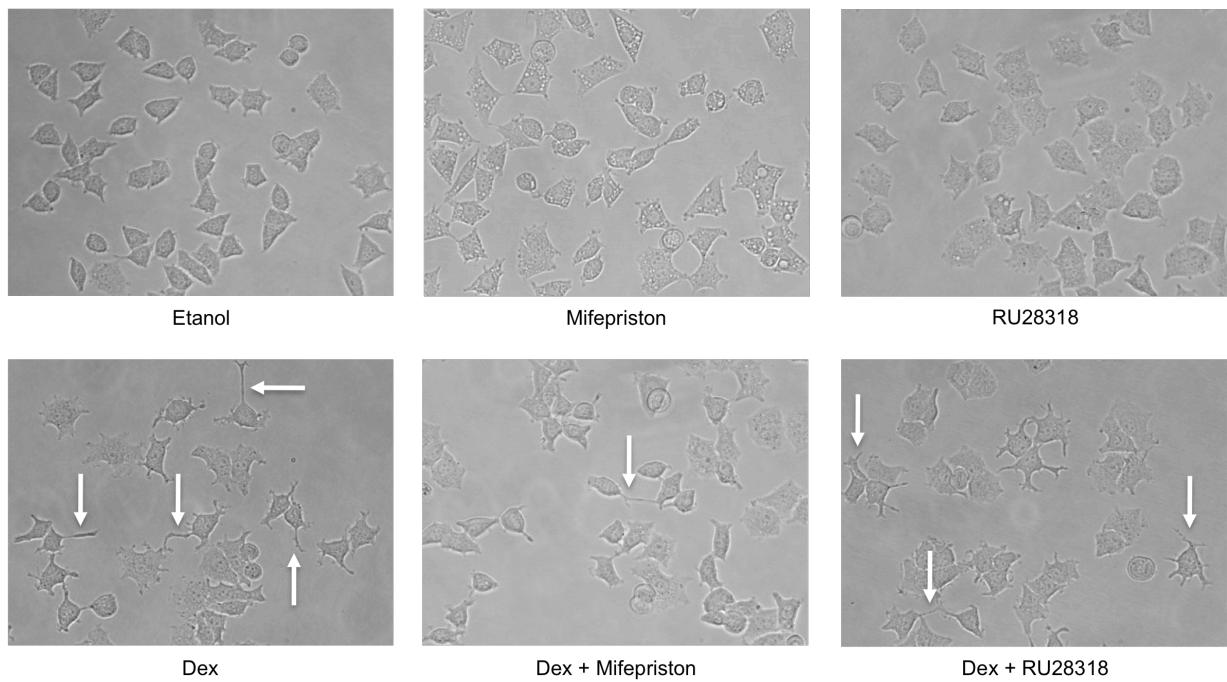
PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Ara-C eller 10 μ M Ara-C tilsatt 10 μ M Dex. 24, 48 og 72 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå fargeløsning, og celledøden kvantifisert i et mikroskop. Ubehandlete celler og celler eksponert for Ara-C tilsatt etanol er brukt som kontroll for henholdsvis Ara-C og Ara-C tilsatt Dex. * $p < 0,05$ sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. # $p < 0,05$ mellom celler eksponert for Ara-C i 24 og 48 timer, og 24 og 72 timer; mellom celler eksponert for Ara-C tilsatt etanol i 24 og 48 timer, og 24 og 72 timer; mellom celler eksponert for Dex i 24 og 48 timer, 24 og 72 timer, og 48 og 72 timer. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent i forhold til totalt antall celler fra uavhengige forsøk med SE, $n = 7-9$.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,2	0,1	9
Ubh	48	1,6	1,1	8
Ubh	72	1,6	0,5	7
Ara-C	24	19,4	3,6	9
Ara-C	48	80,2	3,5	8
Ara-C	72	90,0	2,6	7
Ara-C + EtOH	24	26,5	4,6	9
Ara-C + EtOH	48	78,1	4,5	8
Ara-C + EtOH	72	86,6	5,8	7
Ara-C + Dex	24	20,5	3,7	9
Ara-C + Dex	48	62,5	0,4	8
Ara-C + Dex	72	83,9	7,3	7

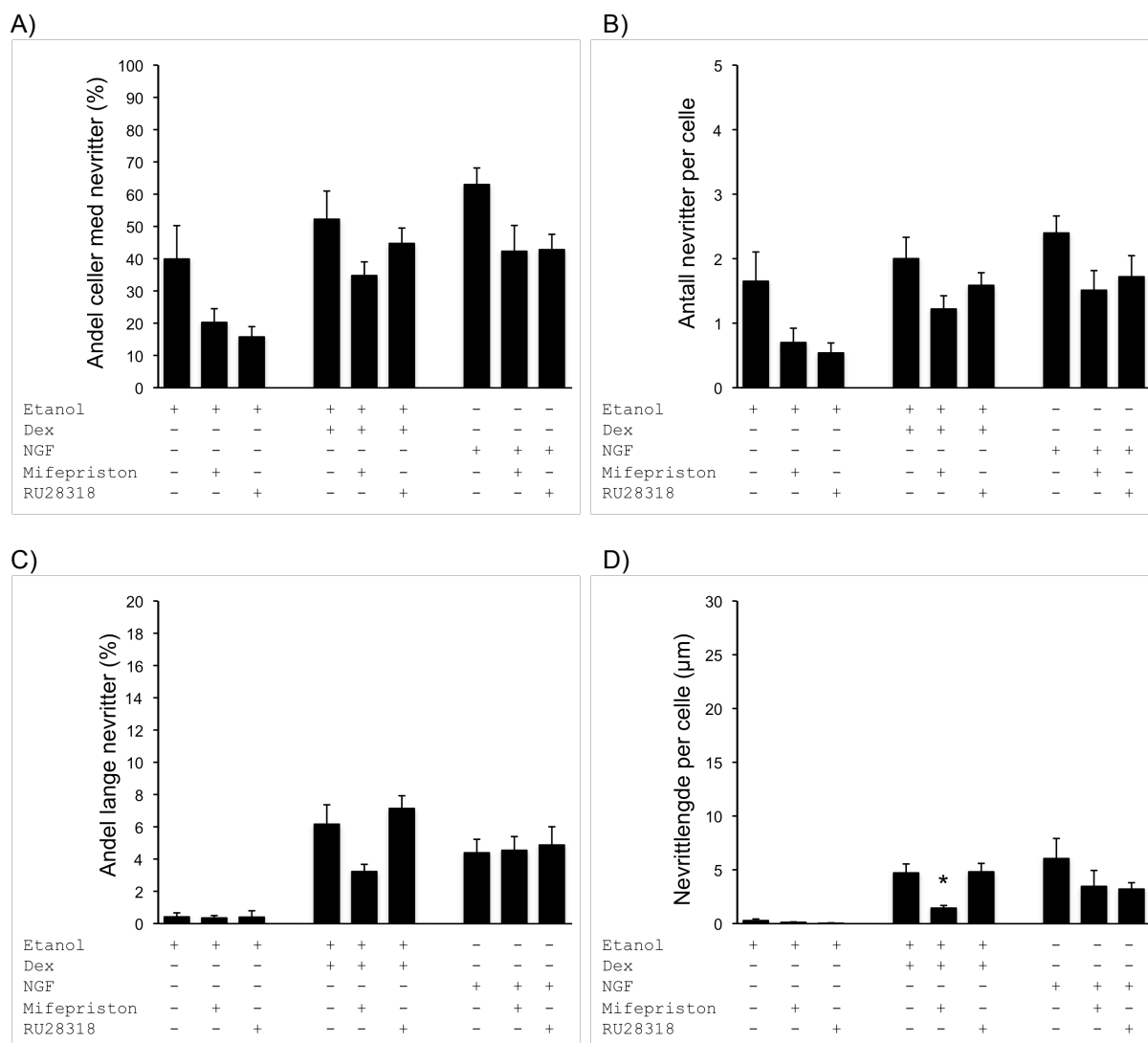
3.1.3 Effekter av mifepriston og RU28318 på nevrittutvekst i PC12-celler eksponert for Dex og NGF

PC12-celler uttrykker GR og MR endogent (Goto, *et al.*, 2009). Det var ønskelig å studere de molekylære mekanismene bak Dex sine effekter på nevrittutvekst i PC12-celler, og om det var regulert av en GR-avhengig signalvei eller en MR-avhengig signalvei. NGF har ikke affinitet for MR eller GR, og ble brukt som negativ kontroll. PC12-celler ble eksponert for GR-antagonisten mifepriston (10 μ M) eller MR-antagonisten RU28318 (10 μ M) alene, eller tilsatt Dex (10 μ M) eller NGF (50 ng/ml) 15 minutter senere. Cellene ble inkubert i 48 timer før analyse i mikroskop. Celler eksponert for etanol, Dex eller NGF ble brukt som kontroller. Fasekontrastbilder tatt 48 timer etter eksponering er vist i figur 3.7. Antagonistene hadde ingen effekt på antall nevritter i celler eksponert for Dex (figur 3.8 A og B). Effekter av Dex på nevrittlengder ble redusert av mifepriston men ikke av RU28318 (figur 3.8 C og D). Mifepriston og RU28318 påvirket ikke nevrittutveksten i celler eksponert for NGF. Behandlingene hadde ingen effekt på celledød (resultater ikke vist).



Figur 3.7. Effekter av Dex på nevrittelengder i PC12-celler hemmes av GR-antagonisten mifepriston men ikke av MR-antagonisten RU28318.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M mifepriston eller 10 μ M RU28318, for deretter å bli eksponert for 10 μ M Dex. Celler eksponert for etanol eller Dex er brukt som kontroller for henholdsvis de to antagonistene og Dex tilsatt de to antagonistene. Fasekontrastbilder er tatt med 40x forstørrelse 48 timer etter eksponering. Pilene peker på eksempler på celler med lange nevritter.



Figur 3.8. GR antagonisten mifepriston reduserer effekter av Dex på nevrittlengder i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M mifepriston eller 10 μ M RU28318, for deretter å bli eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF. Cellene ble studert i et mikroskop 48 timer etter eksponering. Celler eksponert for etanol, Dex eller NGF er brukt som kontroller for henholdsvis de to antagonistene, Dex tilsatt de to antagonistene og NGF tilsatt de to antagonistene. (A) Andel celler med nevritter av totalt antall celler, n=7-9. (B) Antall nevritter per celle, n=7. (C) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, n=7. (D) Nevrittlengde per celle, n=7. *p<0,05 sammenlignet med celler eksponert for Dex, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk med SE.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 A

Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
EtOH	39,9	10,4	9
Mifepriston	20,2	4,2	7
RU28318	15,7	3,2	7
Dex	52,2	8,7	9
Dex + Mifepriston	34,8	4,2	7
Dex + RU28318	44,7	4,8	7
NGF	63,0	5,1	9
NGF + Mifepriston	42,3	8,0	7
NGF + RU28318	42,8	4,8	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 B

Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
EtOH	1,7	0,5	7
Mifepriston	0,7	0,2	7
RU28318	0,5	0,2	7
Dex	2,0	0,3	7
Dex + Mifepriston	1,2	0,2	7
Dex + RU28318	1,6	0,2	7
NGF	2,4	0,3	7
NGF + Mifepriston	1,5	0,3	7
NGF + RU28318	1,7	0,3	7

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 C

Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
EtOH	0,4	0,2	7
Mifepriston	0,3	0,1	7
RU28318	0,4	0,4	7
Dex	6,2	1,2	7
Dex + Mifepriston	3,2	0,4	7
Dex + RU28318	7,1	0,8	7
NGF	4,4	0,8	7
NGF + Mifepriston	4,5	0,9	7
NGF + RU28318	4,9	1,1	7

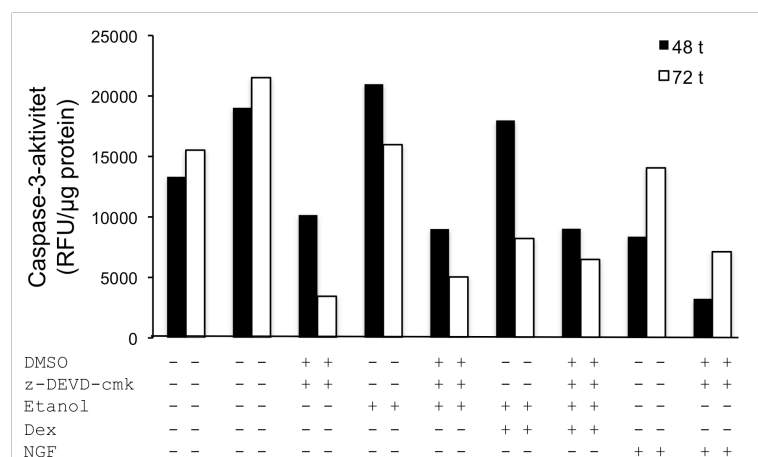
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 D

Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
EtOH	0,3	0,1	7
Mifepriston	0,1	0,0	7
RU28318	0,0	0,0	7
Dex	4,7	0,8	7
Dex + Mifepriston	1,4	0,2	7
Dex + RU28318	4,8	0,8	7
NGF	6,0	1,9	7
NGF + Mifepriston	3,5	1,5	7
NGF + RU28318	3,2	0,6	7

3.2 Effekter av caspase-3 i PC12-celler

3.2.1 Caspase-3-aktivitet i PC12-celler eksponert for Dex og NGF

Siden det tidligere har blitt vist at aktiv caspase-3 spiller en rolle for celleproliferasjon og differensiering (Oomman, *et al.*, 2004), var ønskelig å undersøke hvor mye caspase-3 som ble aktivert i celler behandlet med Dex og NGF. I en tidligere masteroppgave ble staurosporin benyttet som positiv kontroll, for å sikre at caspase-3 aktiveres i PC12-celler. Staurosporin gav økt caspase-aktivitet (Moe, 2010). PC12-celler ble eksponert for caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk (1 μ M), for deretter å blir eksponert for Dex (10 μ M) eller NFG (50 ng/ml) 15 minutter senere. Ubehandlete og etanoleksponerte celler ble brukt som kontroller. Det ble satt på to ubehandlede celleprøver for å sjekke variasjoner i kontrollene. Fluorescens ble målt ved 485/535 nm 24 timer etter høsting. Caspase-3-aktiviteten viste da en gradvis økning. Det var ingen målbar caspase-3-aktivitet i celler høstet etter 4 og 24 timer (resultater ikke vist). Caspase-3-aktiviteten var generelt lav for celler eksponert for Dex og NGF, og ingen av behandlingene gav høyere aktivitet enn tilhørende kontroller (figur 3.9). Det var derimot en caspase-3-aktivitet til stede, siden tilsats av caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk reduserte aktiviteten. Det skal understrekes at forsøket var en pilotstudie, og resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.



Figur 3.9. Caspase-3-aktivitet i PC12-celler eksponert for Dex og NGF.

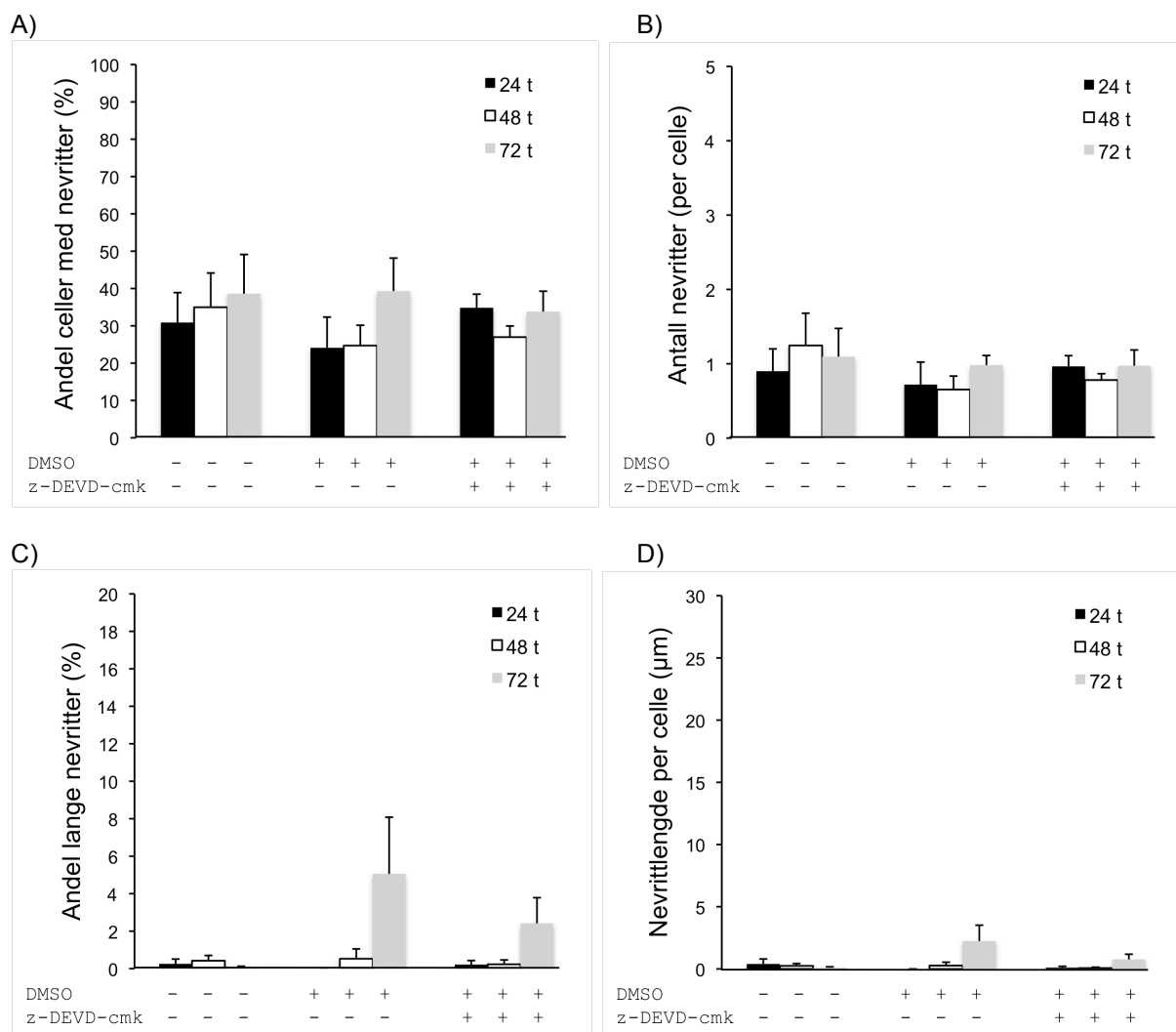
PC12-celler ble eksponert for 1 μ M z-DEVD-cmk, for deretter å bli eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF 15 minutter senere. Ubehandlete og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. Cellene ble høstet 48 og 72 timer etter eksponering, og caspase-3-aktiviteten målt spektrofotometrisk 24 timer etter høsting. Caspase-3-aktiviteten ble målt i RFU (relativ fluorescerende enheter) per μ g protein, med bakgrunnen trukket i fra. Figuren er basert på ett forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Bakgrunn	Fluorescens uten bakgrunn	Fluorescens/ µg protein
Ubh	48	1537	1100	13325,3
Ubh	72	2405	3290	15522,5
Ubh	48	1740	1429	19028,0
Ubh	72	2633	4134	21514,4
z-DEVD-cmk	48	1701	974	10161,7
z-DEVD-cmk	72	2911	643	3439,4
EtOH	48	1291	1800	20979,0
EtOH	72	3232	3159	15974,7
EtOH + z-DEVD-cmk	48	1355	858	9003,1
EtOH + z-DEVD-cmk	72	3212	813	5037,2
Dex	48	1278	1212	17982,2
Dex	72	1328	1067	8217,2
Dex + z-DEVD-cmk	48	860	724	9027,4
Dex + z-DEVD-cmk	72	1327	667	6485,2
NGF	48	945	942	8373,3
NGF	72	2209	2917	14054,4
NGF + z-DEVD-cmk	48	1027	351	3238,0
NGF + z-DEVD-cmk	72	3385	1565	7121,7

3.2.2 Effekter av caspase-3-hemmer på nevritutvekst induisert av Dex og NGF i PC12-celler

Siden det tidligere har blitt vist at caspase-3 spiller en rolle for nevronal differensiering og nevritutvekst (Yan, *et al.*, 2001), var det ønskelig å undersøke om caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak Dex- og NGF-indusert nevritutvekst. PC12-celler ble behandlet med z-DEVD-cmk (1 µM), for deretter å bli eksponert for Dex (10 µM) eller NGF (50 ng/ml) 15 minutter senere. Cellene ble inkubert i 24-72 timer før analyse i mikroskop. Fasekontrastbilder tatt 48 timer etter eksponering er vist i figur 3.12. Caspase-3-hemmeren ble løst i DMSO til en sluttkonsentrasjon på 1‰. For å sikre at DMSO ikke kunne tilskrives mulige effekter, ble kontrollskåler eksponert for tilsvarende DMSO-konsentrasjon eller z-DEVD-cmk alene. DMSO eller z-DEVD-cmk hadde ingen effekt på nevritutvekst sammenlignet med ubehandlet kontroll (Figur 3.10). DMSO og z-DEVD-cmk induserte heller ikke celledød (figur 3.11).



Figur 3.10. DMSO har ingen effekt på nevrittutvekst i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 1% DMSO eller 1 µM z-DEVD-cmk. Cellene ble studert i et mikroskop 24, 48 og 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler er brukt som kontroll. (A) Antall celler med nevritter av totalt antall celler, n=4-9. (B) Antall nevritter per celle, n=4-7. (C) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, n=4-7. (D) Nevrittlengde per celle, n=4-7. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk med SE. Det er ingen forskjeller i nevrittutvekst mellom gruppene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 A

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	30,9	8,0	9
Ubh	48	35,0	9,2	9
Ubh	72	38,6	10,5	9
DMSO	24	24,1	8,2	4
DMSO	48	24,7	5,5	4
DMSO	72	39,3	8,9	4
z-DEVD-cmk	24	34,8	3,6	4
z-DEVD-cmk	48	27,0	3,0	4
z-DEVD-cmk	72	33,8	5,5	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 B

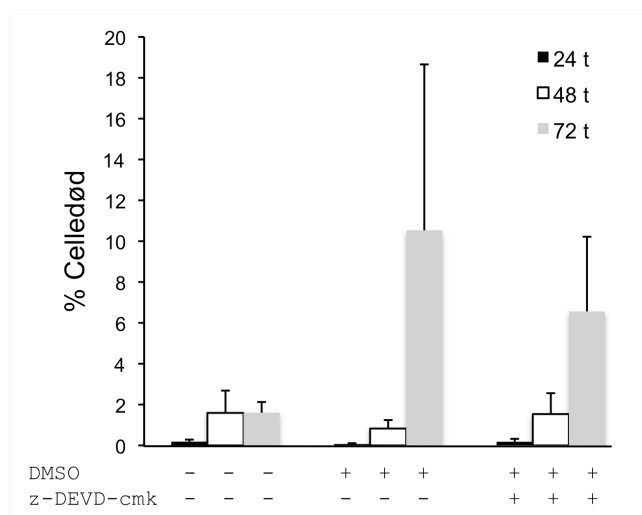
Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,9	0,3	7
Ubh	48	1,2	0,4	7
Ubh	72	1,1	0,4	7
DMSO	24	0,7	0,3	4
DMSO	48	0,7	0,2	4
DMSO	72	1,0	0,1	4
z-DEVD-cmk	24	1,0	0,1	4
z-DEVD-cmk	48	0,8	0,1	4
z-DEVD-cmk	72	1,0	0,2	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 C

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,3	0,3	7
Ubh	48	0,4	0,3	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
DMSO	24	0,0	0,0	4
DMSO	48	0,5	0,5	4
DMSO	72	5,1	3,0	4
z-DEVD-cmk	24	0,2	0,2	4
z-DEVD-cmk	48	0,2	0,2	4
z-DEVD-cmk	72	2,4	1,4	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 D

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,4	0,4	7
Ubh	48	0,2	0,2	7
Ubh	72	0,1	0,1	7
DMSO	24	0,0	0,0	4
DMSO	48	0,3	0,3	4
DMSO	72	2,2	1,3	4
z-DEVD-cmk	24	0,1	0,1	4
z-DEVD-cmk	48	0,1	0,1	4
z-DEVD-cmk	72	0,8	0,4	4



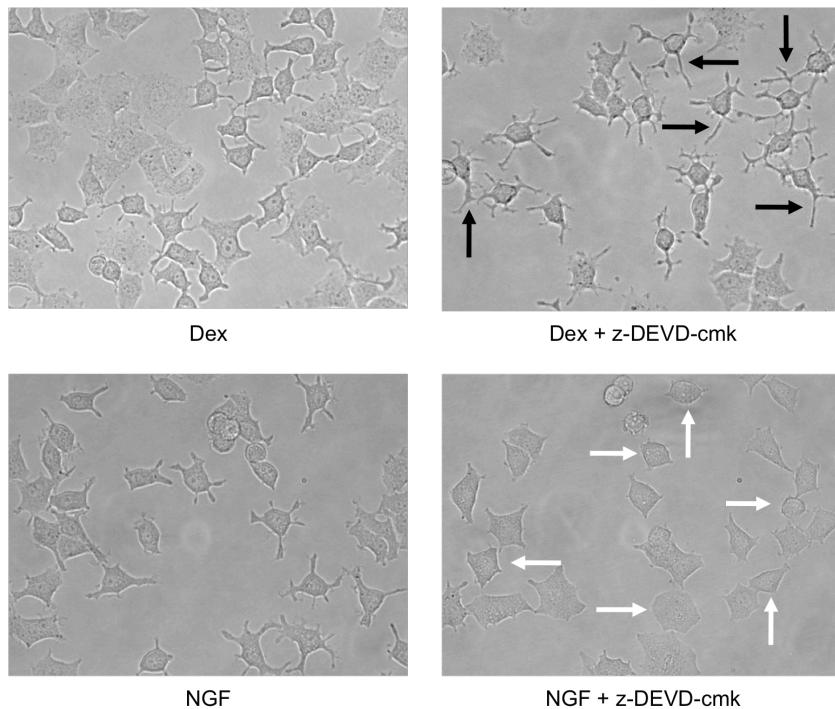
Figur 3.11. DMSO påvirker i liten grad celledøden i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 1 ‰ DMSO eller 1 μ M z-DEVD-cmk. 24, 48 og 72 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå fargeløsning, og celledøden kvantifisert i et mikroskop. Ubehandlete celler er brukt som kontroll. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent i forhold til totalt antall celler fra uavhengige forsøk med SE, n=4-9. Det er ingen forskjeller i celledød mellom gruppene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11

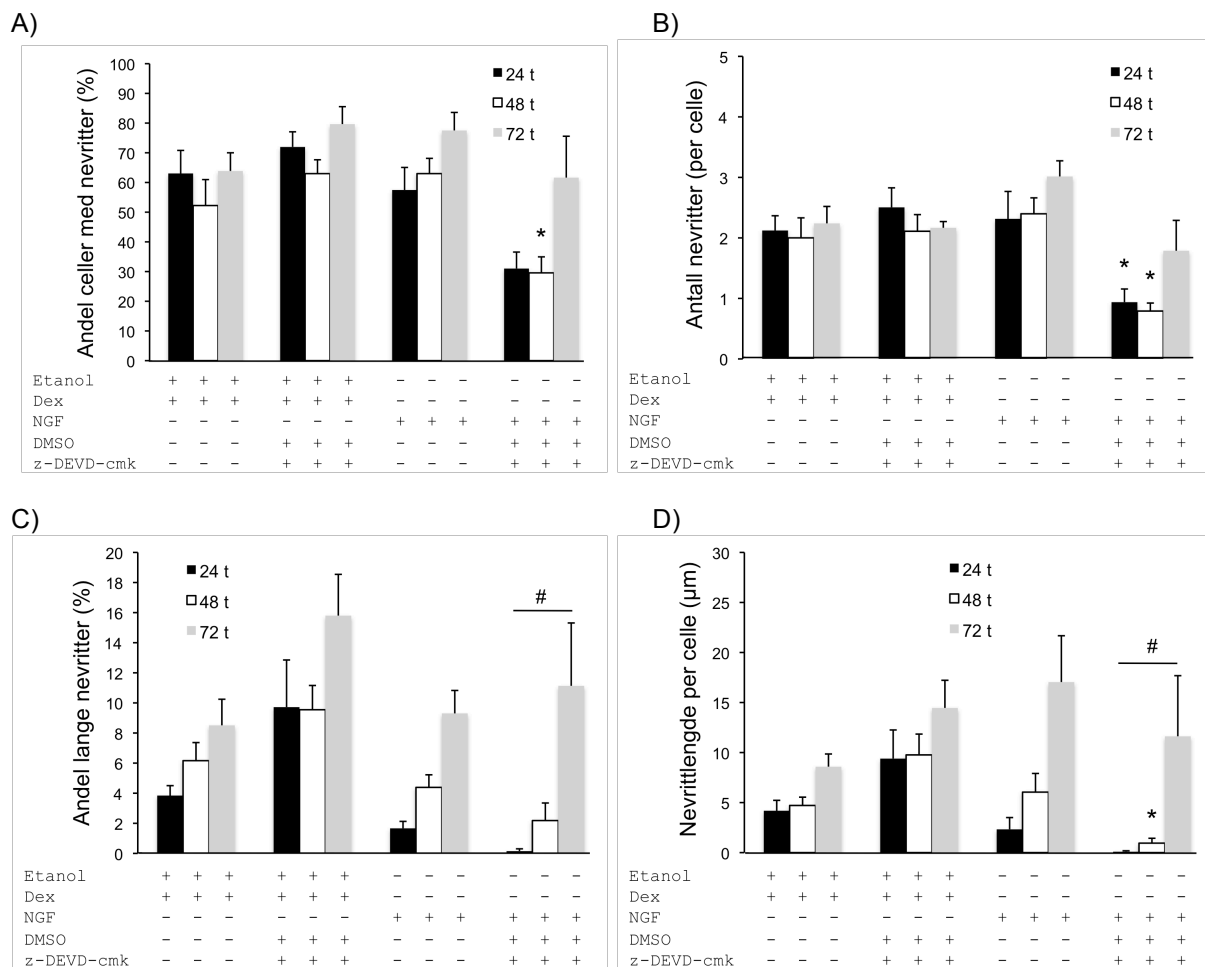
Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24	0,2	0,1	9
Ubh	48	1,6	1,1	9
Ubh	72	1,6	0,5	9
DMSO	24	0,1	0,0	4
DMSO	48	0,8	0,4	4
DMSO	72	10,5	8,1	4
z-DEVD-cmk	24	0,2	0,1	4
z-DEVD-cmk	48	1,5	1,0	4
z-DEVD-cmk	72	6,6	3,7	4

Caspase-3-hemmeren hemmet effekter av NGF på antall nevritter, og gav færre nevritter etter 24 og 48 timer sammenlignet med NGF-kontroll (figur 3.13 A og B). Caspase-3-hemmeren gav også en tidsbegrenset reduksjon av NGF-indusert nevrittlengde (figur 3.13 D). I alle endepunktene var det gjennomgående at caspase-3-hemmeren gav forsinket NGF-indusert nevritutvekst. Caspase-3-hemmeren hadde ingen effekt på antall nevritter i celler eksponert for Dex (figur 3.13 A og B), men resultatene viste en tidsavhengig tendens til økte nevrittlengder (figur 3.13 C og D). Behandlingene induserte ikke celledød (resultater ikke vist).



Figur 3.12. Effekter av caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk på nevrutvekst induisert av Dex og NGF i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 1 μ M z-DEVD-cmk for deretter å bli eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF. Celler eksponert for Dex eller NGF er brukt som kontroll for henholdsvis Dex tilsatt z-DEVD-cmk og NGF tilsatt z-DEVD-cmk. Fasekontrastbilder er tatt med 40x forstørrelse 48 timer etter eksponering. Hvite piler peker på eksempler på celler uten nevrutter, mens sorte piler peker på eksempler på celler med lange nevrutter.



Figur 3.13. Caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk gir en forsinket NGF-indusert nevrittutvekst i PC12-celler.

PC12-celler ble eksponert for 1 μ M z-DEVD-cmk for deretter å bli eksponert for 10 μ M Dex eller 50 ng/ml NGF. Cellene ble studert i et mikroskop 24, 48 og 72 timer etter eksponering. Celler eksponert for Dex eller NGF er brukt som kontroll for henholdsvis Dex tilsatt z-DEVD-cmk og NGF tilsatt z-DEVD-cmk. (A) Andel celler med nevritter av totalt antall celler, $n=4-9$. * $p<0,05$ sammenlignet med NGF-kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (B) Antall nevritter per celle, $n=4-7$. * $p<0,05$ sammenlignet med NGF-kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (C) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, $n=4-7$. # $p<0,05$ mellom celler eksponert for NGF i 24 og 72 timer, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. (D) Nevrittlengde per celle, $n=4-7$. * $p<0,05$ sammenlignet med NGF-kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. # $p<0,05$ mellom celler eksponert for NGF i 24 og 72 timer, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunn's post hoc test. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk med SE.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 A

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Dex	24	63,0	7,8	8
Dex	48	52,2	8,7	9
Dex	72	63,9	6,1	9
Dex + z-DEVD-cmk	24	72,0	5,1	4
Dex + z-DEVD-cmk	48	63,0	4,7	4
Dex + z-DEVD-cmk	72	79,9	5,9	4
NGF	24	57,5	7,6	9
NGF	48	63,0	5,1	9
NGF	72	77,5	6,1	9
NGF + z-DEVD-cmk	24	31,0	5,6	4
NGF + z-DEVD-cmk	48	29,6	5,4	4
NGF + z-DEVD-cmk	72	61,6	13,9	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 B

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Dex	24	2,1	0,2	6
Dex	48	2,0	0,3	7
Dex	72	2,2	0,3	7
Dex + z-DEVD-cmk	24	2,5	0,3	4
Dex + z-DEVD-cmk	48	2,1	0,3	4
Dex + z-DEVD-cmk	72	2,2	0,1	4
NGF	24	2,3	0,5	7
NGF	48	2,4	0,3	7
NGF	72	3,0	0,3	7
NGF + z-DEVD-cmk	24	0,9	0,2	4
NGF + z-DEVD-cmk	48	0,8	0,1	4
NGF + z-DEVD-cmk	72	1,8	0,5	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 C

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Dex	24	3,8	0,7	6
Dex	48	6,2	1,2	7
Dex	72	8,5	1,7	7
Dex + z-DEVD-cmk	24	9,7	3,1	4
Dex + z-DEVD-cmk	48	9,5	1,6	4
Dex + z-DEVD-cmk	72	15,8	2,7	4
NGF	24	1,7	0,5	7
NGF	48	4,4	0,8	7
NGF	72	9,3	1,5	7
NGF + z-DEVD-cmk	24	0,2	0,2	4
NGF + z-DEVD-cmk	48	2,2	1,2	4
NGF + z-DEVD-cmk	72	11,1	4,2	4

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 D

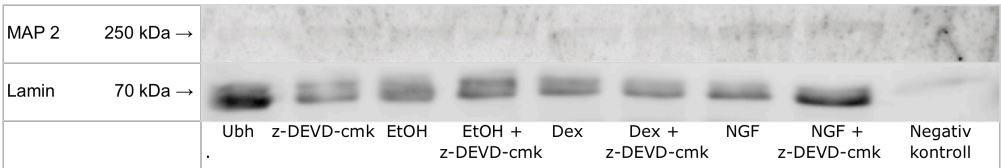
Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Dex	24	4,2	1,0	6
Dex	48	4,7	0,8	7
Dex	72	8,6	1,3	7
Dex + z-DEVD-cmk	24	9,4	2,9	4
Dex + z-DEVD-cmk	48	9,8	2,1	4
Dex + z-DEVD-cmk	72	14,5	2,8	4
NGF	24	2,3	1,2	7
NGF	48	6,0	1,9	7
NGF	72	17,0	4,6	7
NGF + z-DEVD-cmk	24	0,1	0,1	4
NGF + z-DEVD-cmk	48	0,9	0,5	4
NGF + z-DEVD-cmk	72	11,6	6,1	4

Det var ønskelig å undersøke om den midlertidige effekten av caspase-3-hemmer på NGF-indusert nevrutvekst skyldes at caspase-3-hemmeren ble brutt ned i cellene eller var "brukt opp". PC12-celler ble derfor reeksponert for z-DEVD-cmk (1 μ M) 48 timer etter at cellene var blitt behandlet med NGF (50 ng/ml) og z-DEVD-cmk (1 μ M). Cellene ble analysert i mikroskop 24 timer senere. Reeksponering for caspase-3-hemmer hadde ingen effekt på nevrutvekst sammenlignet med NGF-eksponerte celler, og gav ikke færre eller kortere nevrutter (resultater ikke vist).

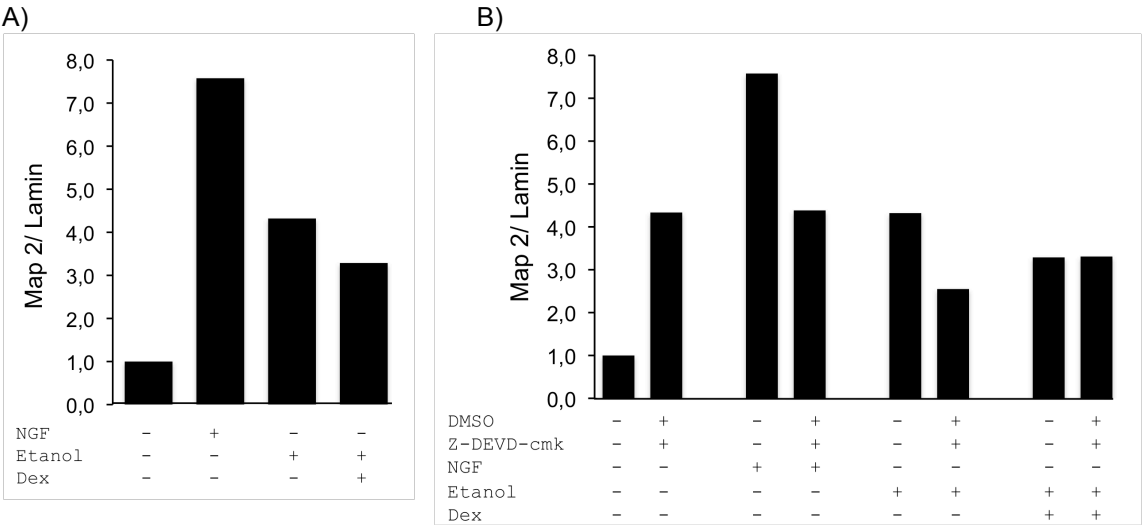
3.2.3 Map 2 som differensieringsmarkør i PC12-celler

Mikrotubulus-assosiert protein 2 (Map 2) uttrykkes av NGF-differensierte PC12-celler (Black, *et al.*, 1986), og det er en direkte korrelasjon mellom økt nevruttlengde og hastigheten på polymerisering av mikrotubuli (Richter-Landsberg, *et al.*, 1983). Det var ønskelig å undersøke om Map 2 kunne benyttes som en tidlig differensieringsmarkør i PC12-celler, og om uttrykket av Map 2 kunne knyttes opp mot effekter av Dex, NGF og caspase-3-hemmer på nevrutvekst (figur 3.2 og 3.13). PC12-celler ble høstet 24 timer etter eksponering, etter at cellene var blitt observert i et lysmikroskop for å sikre at cellene var viable. Etter at Map 2 proteinet var påvist, ble membranene strippet og primært antistoff mot kjerneproteinet lamin påsatt. Lamin ble benyttet som intern standard for å korrigere for forskjeller i proteinmengde mellom prøvene. Proteinbåndene ble semikvantifisert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Gjennomsnittlig antall piksler ble målt, og bakgrunnen trukket i fra. En ubehandlet CV₁-celleprøve ble benyttet som negativ kontroll siden CV₁-celler ikke uttrykker Map

2 endogent. Resultatene viste at Map 2 kunne detekteres i PC12-celler (figur 3.14). Grafisk fremstilling av båndstyrkene, korrigert for proteinmengde med lamin, ble delt i to figurere for å lette sammenligningene mellom de ulike behandlingene. NGF gav et høyere uttrykk av Map 2 sammenlignet med ubehandlet kontroll, et uttrykk som også var høyere enn celler eksponert for Dex (figur 3.15 A). Caspase-3-hemmeren gav et høyere Map 2-uttrykk sammenlignet med ubehandlet kontroll (figur 3.15 B). I celler eksponert for NGF, ble uttrykket av Map 2 redusert ved tilsats av caspase-3-hemmer (figur 3.15 B). Det skal understrekes at forsøket var en pilotstudie, og resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.



Figur 3.14. Proteinbånd for MAP 2 i PC12-celler.
PC12-celler ble eksponert for 10 µM Dex eller 50 ng/ml NGF med eller uten 1 µM z-DEVD-cmk, og høstet 24 timer etter eksponering. Figuren viser proteinbånd for MAP 2 med tilhørende proteinbånd for kjerneproteinet lamin. En CV₁-celleprøve er benyttet som negativ kontroll.



Figur 3.15. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til MAP 2.
(A) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til Map 2 og kjerneproteinet lamin, målt i gjennomsnittlig antall piksler med bakgrunnen trukket i fra. Ubehandlede og etanoleksponerte celler er brukt som kontroll for henholdsvis NGF og Dex. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til Map 2 og kjerneproteinet lamin, målt i gjennomsnittlig antall piksler med bakgrunnen trukket i fra. Ubehandlede celler og celler eksponert for etanol, Dex og NGF ble brukt som kontroller for de samme behandlingene tilsatt z-DEVD-cmk. Figurene er basert på ett og samme forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15 A og B

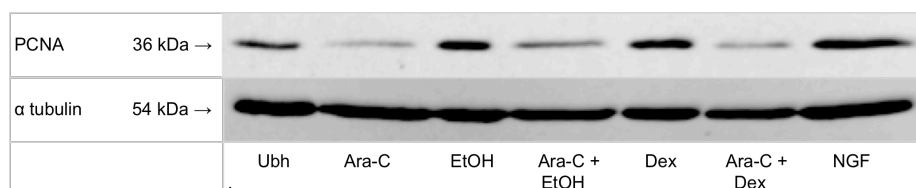
Eksponering	Gjennomsnitt – bakgrunn	Gjennomsnitt – bakgrunn
	Map 2	Lamin
Ubh	2,0	260,0
z-DEVD-cmk	4,7	141,0
NGF	8,7	149,6
NGF + z-DEVD-cmk	9,9	294,2
EtOH	4,5	136,8
EtOH + z-DEVD-cmk	3,0	153,4
Dex	3,7	145,5
Dex + z-DEVD-cmk	3,2	126,1

3.3 Celleproliferasjon i PC12-celler

Områder med lik celletetthet ble bevisst valgt for analyse av PC12-celler i mikroskop. Telling i mikroskop 24-72 timer etter eksponering gav dermed et jevnt nivå av totalt antall celler per synsfelt for de tre eksponeringsseriene (tabell 2.11-2.13) (resultater ikke vist). For å fange opp mulige effekter på celleproliferasjon ble det utført westernblotting-analyser. PC12-celler ble høstet 24 timer etter eksponering, etter at cellene var blitt observert i et lysmikroskop for å sikre at cellene var viable. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ble benyttet som markør for celledeling. PCNA-nivået er viktig for om en celle vil gå i apoptose eller ikke. Ved fravær eller svært lave nivåer av PCNA proteinet, vil apoptose forekomme (Paunesku, *et al.*, 2001). Etter at PCNA proteinet var påvist, ble membranene strippet og primært antistoff mot α tubulin eller β -aktin påsatt. α tubulin ble benyttet som intern standard i de tidligste westernblotting-analysene, for å korrigere for forskjeller i proteinmengde mellom prøvene. I senere westernblotting-analyser ble β -aktin brukt som intern standard. Alle proteinbånd ble semikvantifisert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Maksimalt antall piksler ble målt, og bakgrunnen trukket i fra. Dex, mifepriston og RU28318 ble løst i etanol til en sluttkonsentrasjon på 1 ‰. Alle kontrollskåler benyttet for celler eksponert for minst én av disse reagensene ble derfor tilsatt tilsvarende volum etanol. Alle figurer fra westernblotting av PC12-celler er basert på normaliserte data.

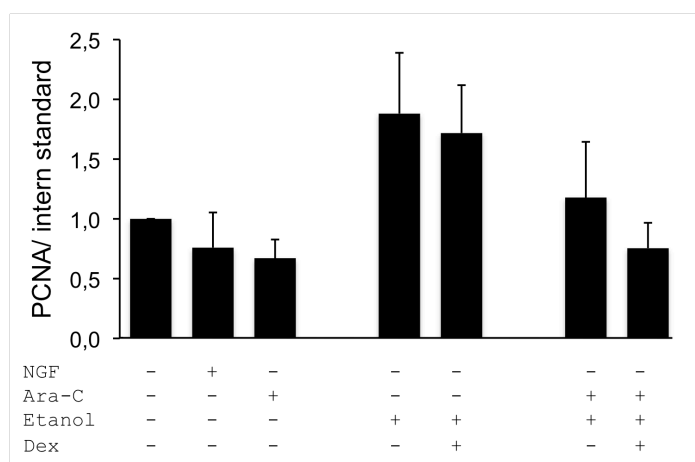
3.3.1 Effekter av Dex, NGF og Ara-C på celleproliferasjon i PC12-celler

Tidligere studier har vist at Dex og NGF hemmer celleproliferasjonen av nevronale celler (Jameson, *et al.*, 2006; J. B. Kim, *et al.*, 2004). Det var derfor ønskelig å undersøke om celleproliferasjon kunne brukes som et endepunkt for effekter av Dex og NGF. Ara-C hemmer celleproliferasjon, og celler eksponert for Ara-C ble brukt som positiv kontroll. Samtidig var det ønskelig å undersøke om tilsats av Dex til Ara-C-eksponerte celler ville ha noen tilleggseffekt. PC12-celler ble eksponert for Dex (10 μ M), NGF (50 ng/ml), Ara-C (10 μ M) eller Ara-C (10 μ M) tilsatt Dex (10 μ M), og inkubert i 24 timer før høsting. Ubehandlede celler, celler eksponert for etanol og celler eksponert for Ara-C tilsatt Dex ble brukt som kontroller. Resultatene viste at uttrykket av PCNA var lavere i celler eksponert for Ara-C (figur 3.16). Korrigert for proteinmengde med α tubulin og β -aktin, gav ingen av behandlingene et endret PCNA-uttrykk sammenlignet med tilhørende kontroller (figur 3.17). Etanol og Dex gav en tendens til høyere PCNA-uttrykk sammenlignet med henholdsvis ubehandlede celler og celler eksponert for NGF.



Figur 3.16. Ara-C hemmer celleproliferasjonen.

PC12-celler ble eksponert for 10 μ M Dex, 50 ng/ml NGF, 10 μ M Ara-C eller 10 μ M Ara-C tilsatt 10 μ M Dex. Cellene ble høstet 24 timer etter eksponering. Figuren viser proteinbånd for PCNA med tilhørende proteinbånd for α tubulin.



Figur 3.17. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til PCNA.

Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til PCNA og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, n=5. α tubulin er benyttet som intern standard i tre av forsøkene og β -aktin i to av forsøkene. Ubehandlede celler er brukt som kontroll for celler eksponert for Ara-C og NGF. Celler eksponert for etanol og etanol tilsatt Dex er brukt som kontroll for henholdsvis Dex og Ara-C tilsatt Dex. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Det er ingen forskjeller i uttrykket av PCNA mellom gruppene.

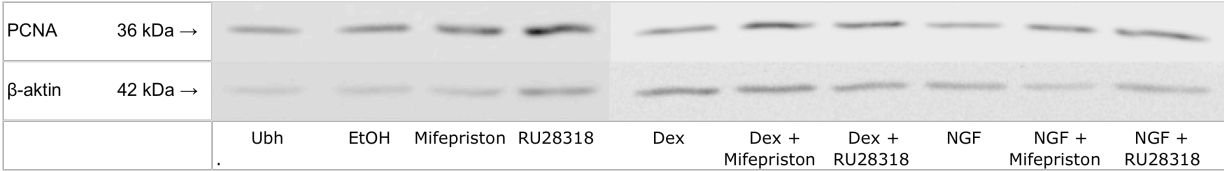
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.17

Eksponering	Gjennomsnitt - bakgrunn PCNA	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh	18057,8	9004,0	31415,4	12915,4	5
NGF	14252,2	10678,2	30191,6	12561,1	5
Ara-C	11497,4	4949,7	29475,6	12304,4	5
EtOH	17767,2	11226,7	32092,4	12994,4	5
Dex	26039,0	10646,4	30158,4	12263,5	5
Ara-C + EtOH	27367,4	8440,5	28313,6	11593,8	5
Ara-C + Dex	20284,0	7520,6	27795,6	11349,1	5

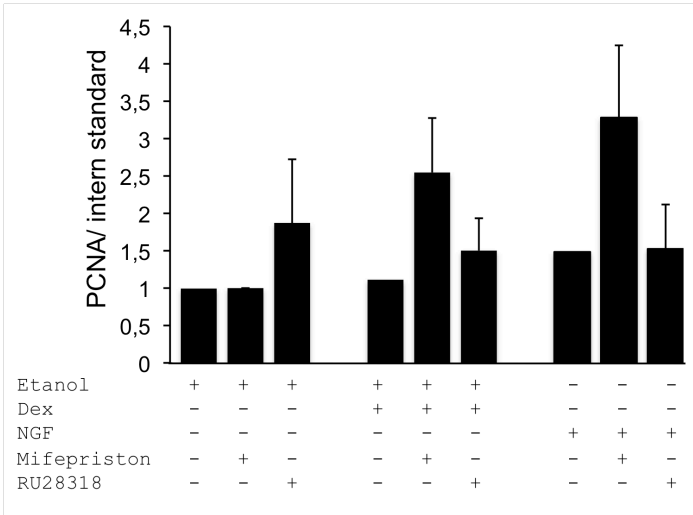
3.3.2 Effekter av mifepriston og RU28318 på celleproliferasjon i Dex-, NGF- og Ara-C-eksponerte PC12-celler

Dex har affinitet for både GR og MR (van Leeuwen, *et al.*, 2010). Siden det tidligere har blitt vist at Dex hemmer celleproliferasjonen, var det ønskelig å undersøke om GR antagonisten mifepriston eller MR antagonisten RU28318 ville ha noen effekt på celleproliferasjon. PC12 celler ble behandlet med mifepriston (10 μ M) eller RU28318 (10 μ M), for deretter å bli eksponert for Dex (10 μ M) eller NGF (50 ng/ml) 15 minutter senere. Celler eksponert for etanol, Dex eller NGF ble brukt som kontroller. Resultatene viste et relativt jevnt uttrykk av PCNA for alle behandlingene, med et noe høyere uttrykk for celler behandlet med mifepriston eller RU28318 (figur 3.18). Korrigert for proteinmengde med α tubulin og β -aktin, var det en tendens til økt

PCNA-uttrykk i celler eksponert for Dex og NGF ved tilsats av mifepriston (figur 3.19). Det ble kun produsert et blot hvor alle kontroller ble påsatt. På de to andre blottene ble det kun påsatt Dex og NGF i kombinasjon med de to antagonistene. Forsøket ble kun utført 1-3 ganger, og resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.



Figur 3.18. Proteinbånd for PCNA.
PC12-celler ble eksponert for 10 µM mifepriston eller 10 µM RU28318, for deretter å bli eksponert for 10 µM Dex eller 50 ng/ml NGF. Cellene ble høstet 24 timer etter eksponering. Figuren viser proteinbånd for PCNA med tilhørende proteinbånd for β-aktin.



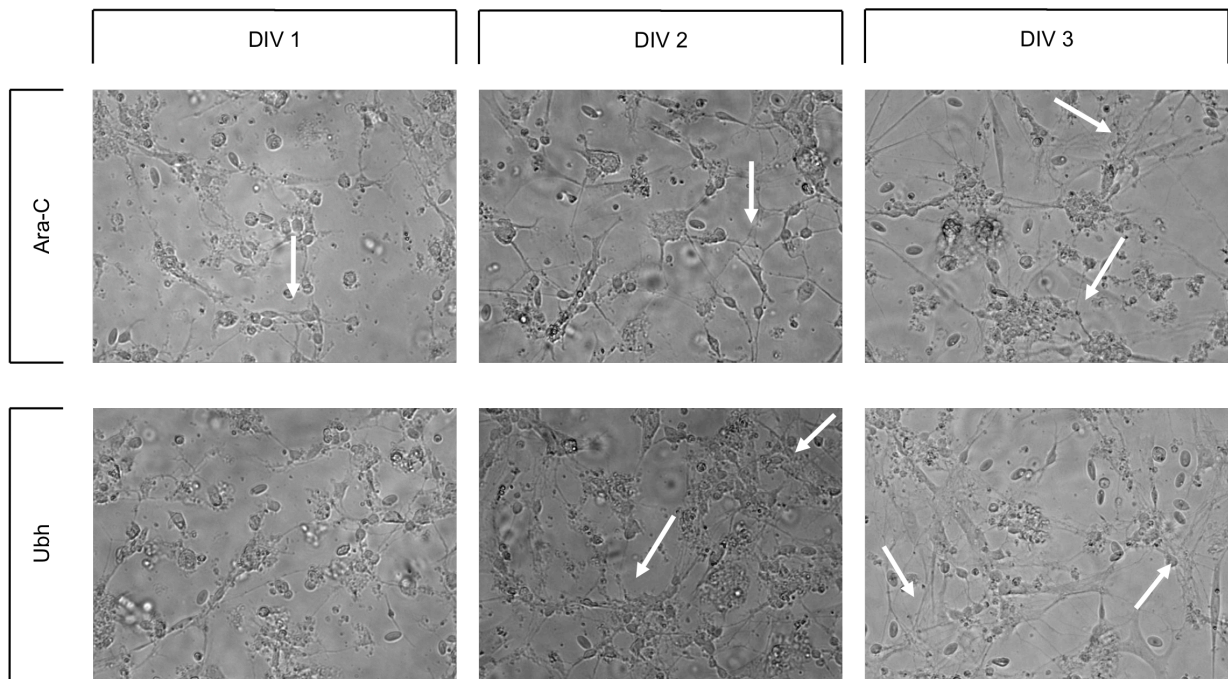
Figur 3.19. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til PCNA.
Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til PCNA og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, n=1-3. α tubulin er benyttet som intern standard i ett av forsøkene og β-aktin i to av forsøkene. Celler eksponert for etanol, Dex og NGF er brukt som kontroller for henholdsvis de samme behandlingene tilsatt mifepriston eller RU28318. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Det er ingen forskjeller i uttrykket av PCNA mellom gruppene. Det ble kun utført ett forsøk med de tre kontrollene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.19

Eksponering	Gjennomsnitt- bakgrunn PCNA	SE	Gjennomsnitt- bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
EtOH	204,3	-	31,7	-	1
Mifepriston	4269,8	3873,7	19830,9	19572,5	3
RU28318	14066,8	13447,5	19090,2	18753,0	3
Dex	235,5	-	32,7	-	1
Dex + Mifepriston	15477,9	14871,2	18632,2	18403,8	3
Dex + RU28318	4191,5	3222,9	19347,5	18728,9	3
NGF	179,5	-	18,7	-	1
NGF + Mifepriston	14575,9	13939,2	15627,2	15284,1	3
NGF + RU28318	3477,5	2264,7	18969,5	18088,7	3

3.4 Nevrittutvekst i korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling

Det var ønskelig å studere nevrututvekst i kornceller fra lillehjerne under utvikling i kultur, for å studere nevronenes utvikling. Ara-C benyttes ofte i korncellekulturer for å hindre proliferasjon av astrocytter, og gi en mer homogen nevronkultur. Det var derfor også ønskelig å undersøke hvilken effekt Ara-C hadde på nevrututvekst. Korncellekulturer behandlet med eller uten Ara-C dagen etter utplating, dag 1 *in vitro* (DIV 1), ble studert i et mikroskop fra DIV 1 til DIV 6 i kultur. Antall nevrutter og nevruttlengder økte fra DIV 1 til DIV 3 (figur 3.20), med et stadig mer avansert nettverk av nevrutter. Det viste seg å være vanskelig og kvantifisere korncellenes nevrutter allerede på DIV 2 i kultur, og av den grunn ble korncellene ikke forsøkt analysert i mikroskop fra DIV 4 til DIV 6. Korncellene utviklet raskt lange nevrutter, og det var problematisk å skille nevruttene fra hverandre og lokalisere start- og endepunkter. I ubehandlede korncellekulturer var det også vanskelig å avgjøre om nevruttene tilhørte kornceller eller andre celler til stede i cellekulturen. Manuell kvantifisering av nevrututvekst i kornceller over tid gav svært varierende resultater (resultater ikke vist).



Figur 3.20. Morfologisk utvikling av nevritter i korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling over tid.

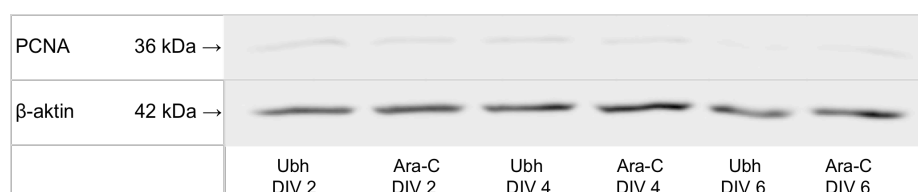
Korncellekulturer ble behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, og studert i et mikroskop fra DIV 1 til DIV 3 i kultur. Cellene på øverste rad er eksponert for Ara-C mens cellene på nederste rad er ubehandlet. Fasekontrastbilder er tatt med 40x forstørrelse. Pilene peker på områder hvor det var vanskelig å kvantifisere nevrittutvekst.

3.5 Proliferasjon, differensiering og modning av korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling

For å studere hvordan kornceller prolifererer, differensierer og modnes over tid, og om tilsats av Ara-C hadde noen påvirkning, ble det utført westernblotting-analyser. Korncellekulturer behandlet med eller uten Ara-C på DIV 1 i kultur, ble høstet på DIV 2, 4 og 6. Før cellene ble høstet, ble skålene observert i et lysmikroskop for å sikre at cellene var viable. Etter at ønskede proteiner var påvist, ble membranene strippet og primært antistoff mot α tubulin, β -aktin eller kjerneproteinet lamin påsatt. α tubulin, β -aktin eller lamin ble benyttet som intern standard for å korrigere for forskjeller i proteinmengde mellom prøvene. Alle proteinbånd ble semikvantifisert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Maksimalt antall piksler ble målt, og bakgrunnen trukket i fra. Alle figurer fra westernblotting av korncellekulturer er basert på normaliserte data. Siden celletallet og antall nevritter øker over tid, vil også mengde α tubulin og β -aktin kunne øke over tid. Båndstyrken til alle markørene ble derfor også kvantifisert uten å korrigere for mengde protein.

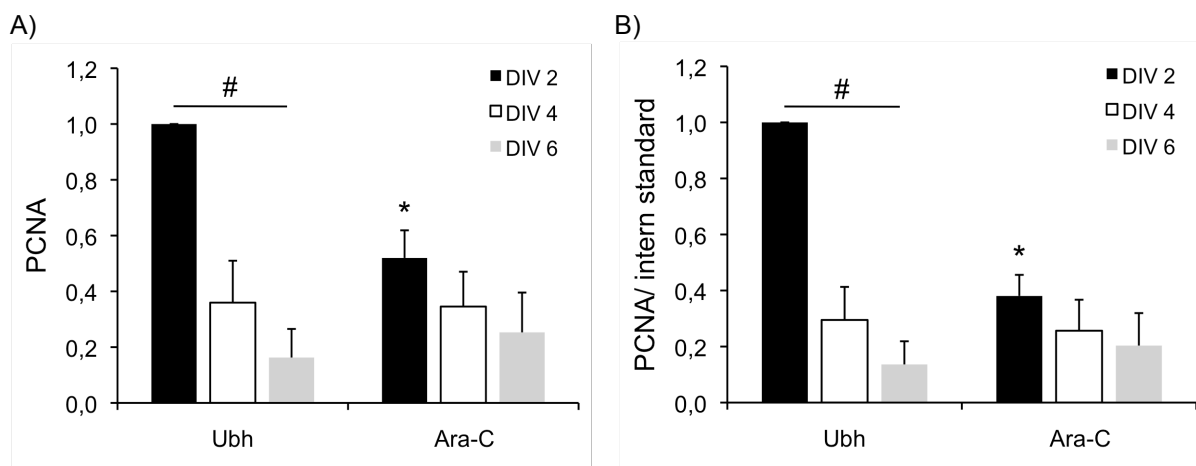
3.5.1 Celleproliferasjon i korncellekulturer og påvirkning fra Ara-C

For å studere cellenes proliferasjon ble Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) benyttet som markør. Resultatene viste at uttrykket av PCNA kunne påvises fra DIV 2 til DIV 6 i kultur, både med og uten Ara-C-behandling (figur 3.21). Korrigert for proteinmengde med α tubulin og β -aktin, var det en tidsavhengig reduksjon i uttrykket av PCNA i ubehandlede celler (figur 3.22 B). Celler behandlet med Ara-C hadde et jevnere PCNA-uttrykk, med et redusert uttrykk på DIV 2 sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt. Ukorrigert for proteinmengde var resultatene de samme (figur 3.22 A).



Figur 3.21. Uttrykket av PCNA i korncellekulturer avtar over tid i kultur.

Korncellekulturer behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6 i kultur. Figuren viser proteinbånd for PCNA med tilhørende proteinbånd for β -aktin.



Figur 3.22. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til PCNA.

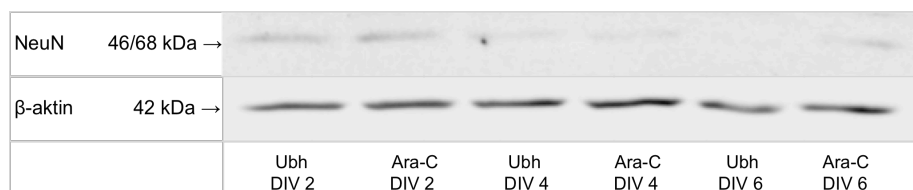
(A) Båndstyrken til PCNA sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE, $n=4$. * $p<0,05$ sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. # $p<0,05$ mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 6, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til PCNA og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, $n=4$. * $p<0,05$ sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. # $p<0,05$ mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 6, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. α tubulin er benyttet som intern standard i to av forsøkene og β -aktin i to av forsøkene. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.22

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn PCNA	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh, DIV 2	16841,5	9994,0	839,2	505,4	4
Ubh, DIV 4	3593,8	2154,0	750,5	379,4	4
Ubh, DIV 6	293,5	267,1	1014,7	401,5	4
Ara-C, DIV 2	9237,5	6934,8	983,2	584,8	4
Ara-C, DIV 4	3359,8	2876,9	972,1	509,6	4
Ara-C, DIV 6	669,0	627,2	1127,5	426,7	4

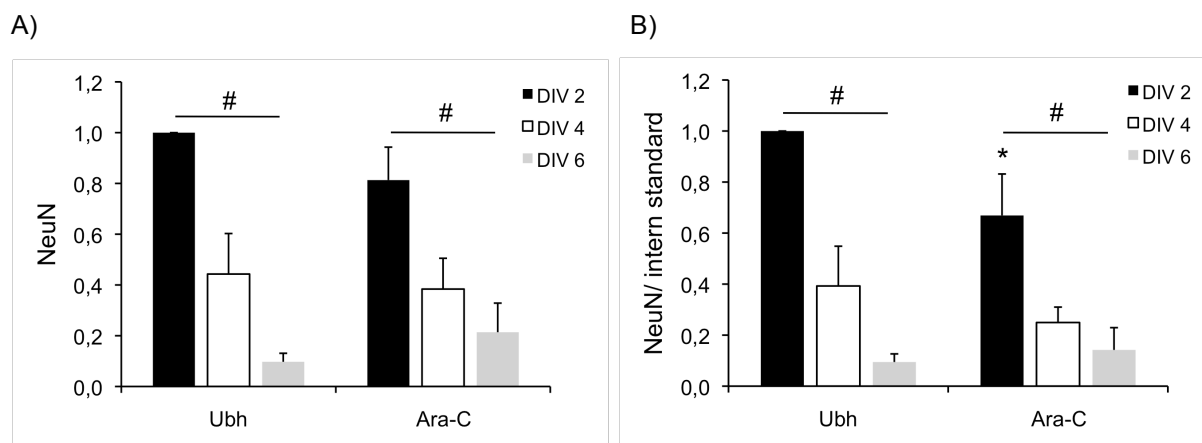
3.5.2 Differensiering av kornceller og påvirkning fra Ara-C

For å studere korncellenes differensiering ble Neuronal Nuclei (NeuN) benyttet som markør. NeuN opptrer tidlig i utviklingen av nevronale celler, etter at cellene har forlatt celledyklusen og er ferdig med å dele seg (Mullen, *et al.*, 1992). Resultatene viste at uttrykket av NeuN avtok fra DIV 2 til DIV 6, både med og uten Ara-C-behandling (figur 3.23). Korrigert for proteinmengde med α tubulin og β -aktin, var det en tidsavhengig reduksjon i uttrykket av NeuN både for korncellekultur behandlet med og uten Ara-C (figur 3.24 B). Celler behandlet med Ara-C hadde et redusert NeuN-uttrykk på DIV 2 sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt. Ukorrigert for proteinmengde reduserte ikke Ara-C NeuN-uttrykket på DIV 2 (figur 3.24 A).



Figur 3.23. Uttrykket av NeuN i korncellekulturer synker fra DIV 2 til DIV 6 i kultur.

Korncellekulturer behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6 i kultur. Figuren viser proteinbånd for NeuN med tilhørende proteinbånd for β -aktin.



Figur 3.24. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til NeuN.

(A) Båndstyrken til NeuN sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE, $n=4$. # $p<0,05$ mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 6; mellom celler behandlet med Ara-C DIV 2 og DIV 6. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NeuN og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, $n=4$. * $p<0,05$ sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. # $p<0,05$ mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 6; mellom celler behandlet med Ara-C DIV 2 og DIV 6. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. α tubulin er benyttet som intern standard i to av forsøkene og β -aktin i to av forsøkene. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk.

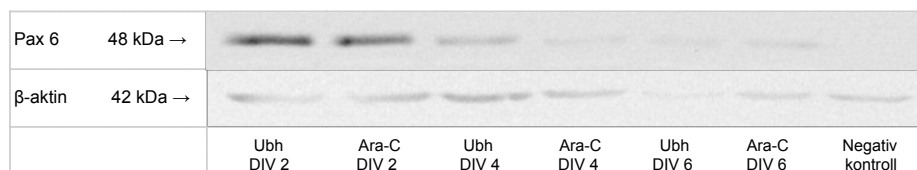
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24 A og B

Eksponering	Gjennomsnitt - bakgrunn NeuN	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh, DIV 2	2424,8	1469,2	839,2	505,5	4
Ubh, DIV 4	1335,5	731,5	750,5	379,4	4
Ubh, DIV 6	290,8	163,6	1014,7	401,5	4
Ara-C, DIV 2	1690,3	1164,0	983,4	584,7	4
Ara-C, DIV 4	1169,0	651,2	972,0	509,6	4
Ara-C, DIV 6	388,5	187,5	1127,5	426,7	4

3.5.3 Migrering av kornceller og påvirkning fra Ara-C

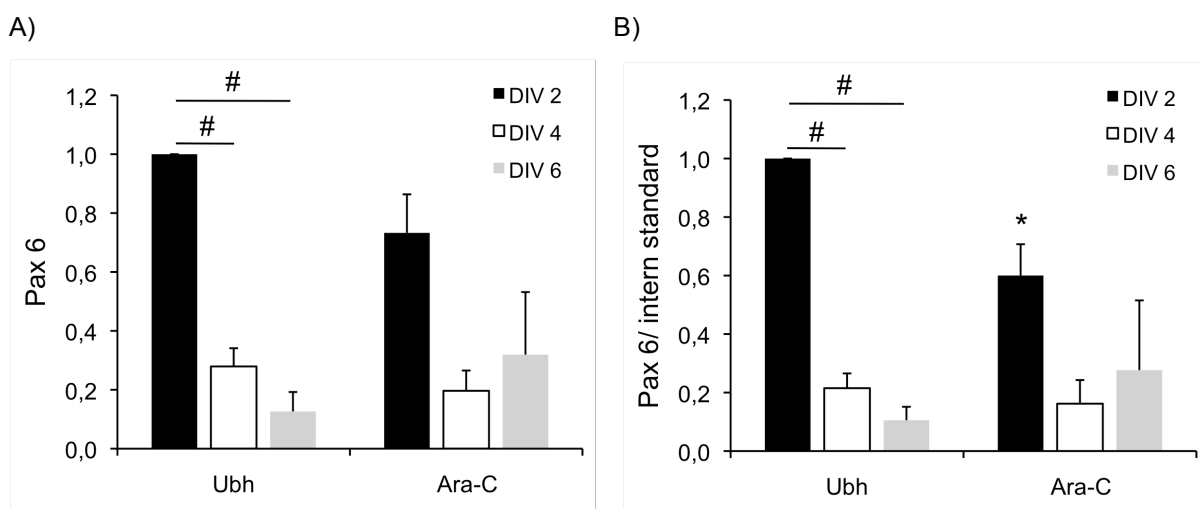
For å studere korncellenes migrering ble Pax 6 benyttet som markør. Pax 6-positive celler er funnet under tidlig migrasjon når den umodne korncellen vandrer fra lillehjernebarkens ytre til indre lag (Chung, *et al.*, 2010). CV₁-celler ble benyttet som negativ kontroll, siden CV₁-celler ikke uttrykker Pax 6 endogent. Resultatene viste at uttrykket av Pax 6 avtok fra DIV 2 til DIV 6, både med og uten Ara-C-behandling (figur 3.25). Korrigert for proteinmengde med α tubulin og β -aktin, var det en tidsavhengig reduksjon i uttrykket av Pax 6 for ubehandlede celler (figur 3.26 B). Celler behandlet med Ara-C hadde et redusert Pax 6-uttrykk på DIV 2 sammenlignet

med ubehandlede celler ved samme tidspunkt. Ukorrigert for proteinmengde reduserte ikke Ara-C Pax 6-uttrykket på DIV 2 (figur 3.26 A).



Figur 3.25. Uttrykket av Pax 6 i korncellekulturer synker fra DIV 2 til DIV 6 i kultur.

Korncellekulturer behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6 i kultur. Figuren viser proteinbånd for Pax 6 med tilhørende proteinbånd for β -aktin. En ubehandlet CV₁-celleprøve er benyttet som negativ kontroll.



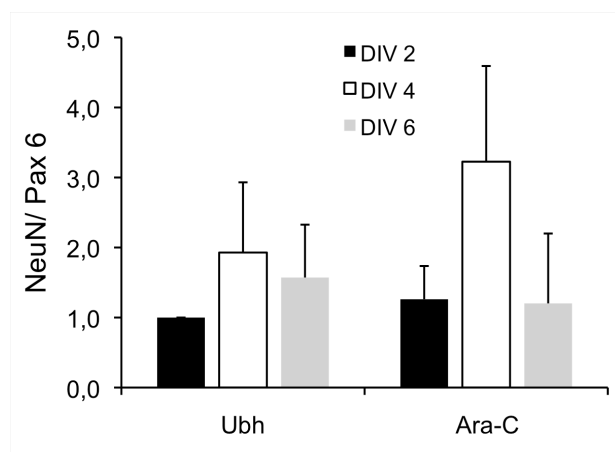
Figur 3.26. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til Pax 6.

(A) Båndstyrken til Pax 6 sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE, n=6. #p<0,05 mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 4, og DIV 2 og DIV 6. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til Pax 6 og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, n=6. *p<0,05 sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. #p<0,05 mellom ubehandlede celler DIV 2 og DIV 4, og DIV 2 og DIV 6. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. α tubulin er benyttet som intern standard i to av forsøkene og β -aktin i fire av forsøkene. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26 A og B

Eksponering	Gjennomsnitt - bakgrunn Pax 6	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh, DIV 2	29,8	9,9	561,3	364,8	6
Ubh, DIV 4	8,0	3,4	503,3	286,4	6
Ubh, DIV 6	3,8	1,7	679,2	330,9	6
Ara-C, DIV 2	21,5	10,5	658,7	423,0	6
Ara-C, DIV 4	4,0	1,5	649,9	381,3	6
Ara-C, DIV 6	13,2	9,9	753,5	358,9	6

Siden det så ut som uttrykket av Pax 6 falt fortere enn uttrykket av NeuN, ble forholdet mellom de to markørene kvantifisert. Resultatene viste at forholdet mellom NeuN og Pax 6 endres over tid, med en topp på DIV 4 både for celler behandlet med og uten Ara-C (figur 3.27).



Figur 3.27. Grafisk fremstilling av forholdet mellom NeuN og Pax 6.

Forholdet mellom båndstyrken til NeuN og Pax 6 sine proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE. Det er ingen forskjeller i forholdet mellom NeuN og Pax 6 ved noen av tidspunktene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.27

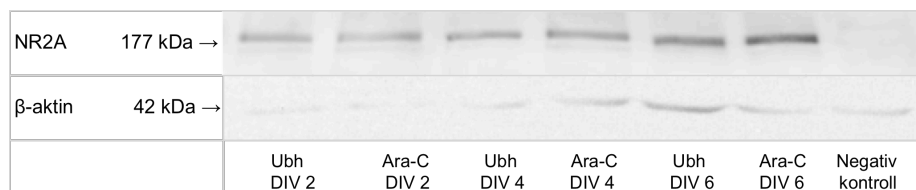
Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn	Gjennomsnitt - bakgrunn
	NeuN	Pax 6
Ubh, DIV 2	2424,8	29,8
Ubh, DIV 4	1335,5	8,0
Ubh, DIV 6	290,8	3,8
Ara-C, DIV 2	1690,3	21,5
Ara-C, DIV 4	1169,0	4,0
Ara-C, DIV 6	388,5	13,2

3.5.4 Modning av kornceller og påvirkning fra Ara-C

For å studere korncellenes modning ble NMDA-reseptorsubenheterne NR2A og NR2B benyttet som markører. CV₁-celler ble benyttet som negativ kontroll, siden CV₁-celler ikke uttrykker NMDA-reseptorsubenheter endogent. Fire westernblotting-analyser ble utført for NR2A og NR2B. Uttrykket av de to markørene var varierende mellom ulike forsøk, og resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.

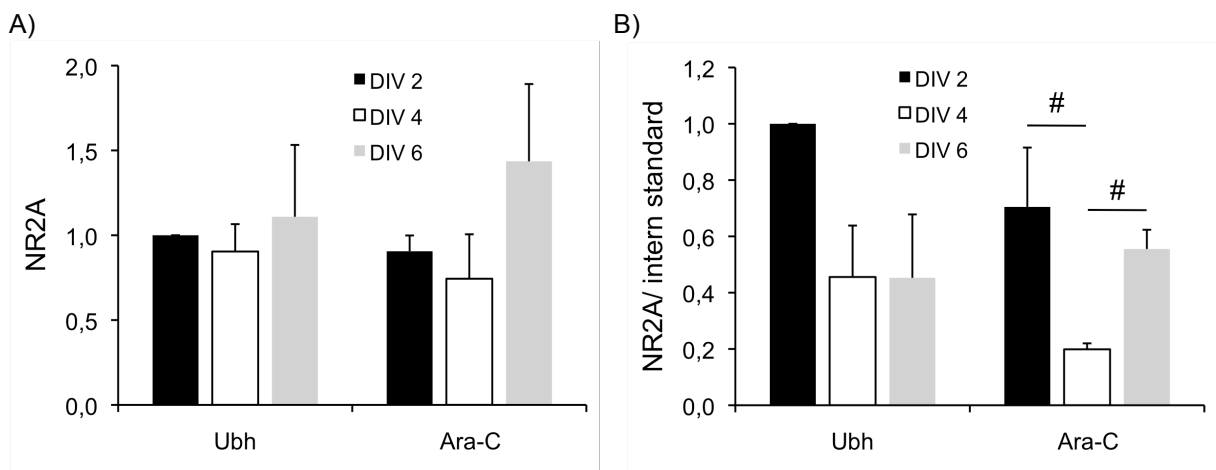
Proteinbånd for NR2A i korncellekulturer

Resultatene viste at uttrykket av NR2A kunne påvises fra DIV 2 til DIV 6 i kultur, både med og uten Ara-C-behandling (figur 3.28). Korrigert for proteinmengde med β -aktin og lamin, var NR2A-uttrykket høyest på DIV 2 både for celler behandlet med og uten Ara-C (figur 3.29 B). Ukorrigert for proteinmengde var uttrykket av NR2A i ubehandlede celler jevnt, mens celler behandlet med Ara-C hadde en topp på DIV 6 (figur 3.29 A).



Figur 3.28. NR2A uttrykkes på alle tidspunkter i kultur.

Korncellekulturer behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6 i kultur. Figuren viser proteinbånd for NR2A med tilhørende proteinbånd for β -aktin. En ubehandlet CV₁-celleprøve er benyttet som negativ kontroll.



Figur 3.29. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til NR2A.

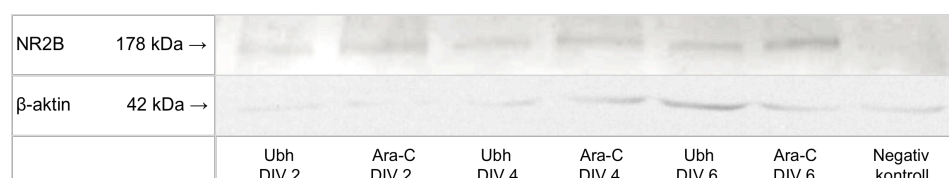
(A) Båndstyrken til NR2A sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE, $n=4$. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR2A og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, $n=4$. # $p < 0,05$ mellom celler behandlet med Ara-C DIV 2 og DIV 4, og DIV 4 og DIV 6. Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns' post hoc test. β -aktin er benyttet som intern standard i to av forsøkene og lamin i to av forsøkene. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.29 A og B

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn NR2A	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh, DIV 2	258,2	64,8	5,1	1,9	4
Ubh, DIV 4	205,4	26,0	21,6	14,3	4
Ubh, DIV 6	215,8	47,5	17,4	10,0	4
Ara-C, DIV 2	224,6	49,5	19,5	12,7	4
Ara-C, DIV 4	154,6	36,0	9,6	5,0	4
Ara-C, DIV 6	299,0	57,4	11,3	5,5	4

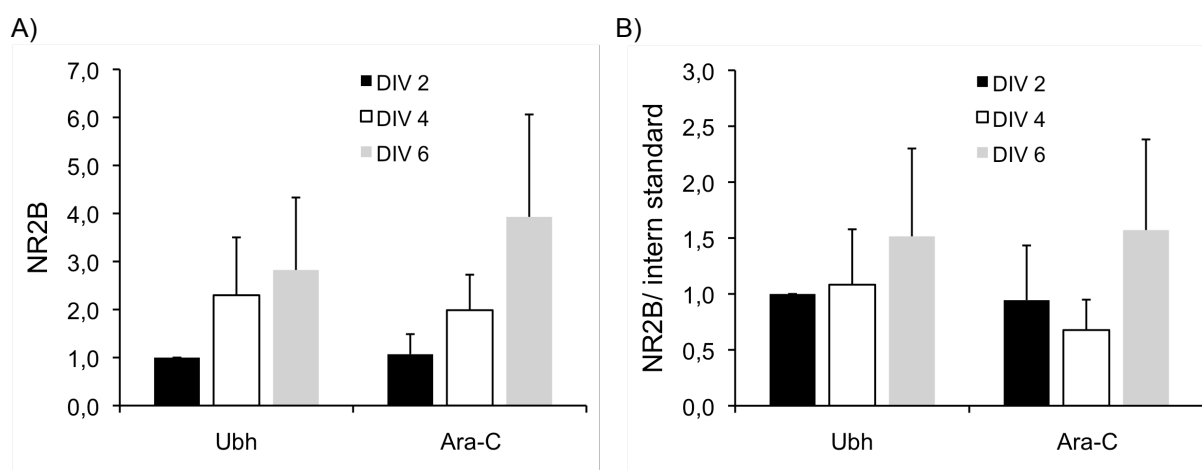
Proteinbånd for NR2B i korncellekulturer

Resultatene viste at uttrykket av NR2B kunne påvises fra DIV 2 til DIV 6 i kultur, både med og uten Ara-C-behandling (figur 3.30). Både ukorrigert og korrigert for proteinmengde med β -aktin og lamin var uttrykket av NR2B størst på DIV 6, både for celler behandlet med og uten Ara-C (figur 3.31).



Figur 3.30. NR2B uttrykkes på alle tidspunkter i kultur.

Korncellekulturer behandlet med eller uten 10 μ M Ara-C dagen etter utplating, ble høstet på DIV 2, DIV 4 og DIV 6 i kultur. Figuren viser proteinbånd for NR2B med tilhørende proteinbånd for β -aktin. En ubehandlet CV₁-celleprøve er benyttet som negativ kontroll.



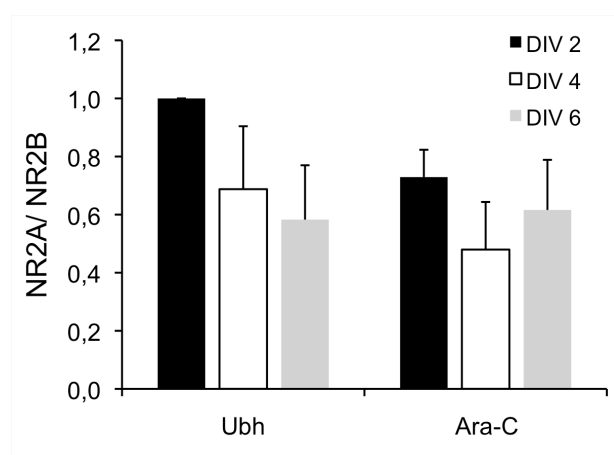
Figur 3.31. Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til NR2B.

(A) Båndstyrken til NR2B sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE, n=4. (B) Proteinbåndene fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR2A og intern standard, målt i maksimalt antall piksler med bakgrunnen trukket i fra og SE, n=4. β -aktin er benyttet som intern standard i to av forsøkene og lamin i to av forsøkene. Figurene viser gjennomsnittlige verdier fra uavhengige forsøk. Det er ingen forskjeller i uttrykket av NR2B mellom celler behandlet med eller uten Ara-C ved noen av tidspunktene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.31 A og B

Eksponering	Gjennomsnitt - bakgrunn NR2B	SE	Gjennomsnitt - bakgrunn intern standard	SE	Antall forsøk
Ubh, DIV 2	86,0	38,3	5,1	1,9	4
Ubh, DIV 4	88,9	19,0	21,6	14,3	4
Ubh, DIV 6	99,1	10,2	17,4	10,0	4
Ara-C, DIV 2	96,4	40,5	19,5	12,7	4
Ara-C, DIV 4	91,0	19,4	9,6	5,0	4
Ara-C, DIV 6	134,4	14,9	11,3	5,5	4

Kvantifisering av forholdet mellom NR2A og NR2B, viste at forholdet mellom de to markørene varierer på ulike dager i kultur (figur 3.32). Mellom DIV 2 og DIV 6 var det et bytte i forholdet mellom NR2A og NR2B for celler behandlet med Ara-C.



Figur 3.32. Grafisk fremstilling av forholdet mellom NR2A og NR2B.

Forholdet mellom båndstyrken til NR2A og NR2B sine proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall piksler med SE. Det er ingen forskjeller i forholdet mellom NR2A og NR2B ved noen av tidspunktene.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.32

Eksponering	Gjennomsnitt - bakgrunn NR2A	Gjennomsnitt - bakgrunn NR2B
Ubh, DIV 2	258,2	86,0
Ubh, DIV 4	205,4	88,9
Ubh, DIV 6	215,8	99,1
Ara-C, DIV 2	224,6	96,4
Ara-C, DIV 4	154,6	91,0
Ara-C, DIV 6	299,0	134,4

4. Diskusjon

4.1 Diskusjon av metoder

4.1.1 Valg av cellemodeller

I denne oppgaven har PC12-celler og primærkulturer av kornceller fra lillehjerne hos kylling blitt benyttet som modeller for å studere nevronal utvikling. En cellelinje er en definert populasjon av celler som kan dyrkes i kultur over lengre tid. Cellelinjer er vanligvis klonet, og stammer fra én enkel forløpercelle. Dette gjør at cellelinjer gir mer reproducerbare resultater sammenlignet med primære cellekulturer, fordi de utgjør en homogen populasjon av celler (Radio og Mundy, 2008b). PC12-celler er en nevronal cellelinje, og deler mange av de morfologiske og funksjonelle egenskapene til nevroner. PC12-celler syntetiserer og lagrer nevrotransmittorne dopamin, noradrenalin og acetylkolin, og uttrykker Na^{2+} -, K^{+} - og Ca^{2+} -kanaler (Shafer og Atchison, 1991). I respons til NGF går cellene gradvis ut av celledyklus, og differensierer til nevronlignende celler (Fujita, et al., 1989). PC12-celler er kreftceller, og vil derfor ikke være identisk med "normale" nevroner. Nevritter kan ikke karakteriseres som aksoner eller dendritter, og de har ikke funksjonelle synapser (Radio, et al., 2010). Cellene kan også endre seg genetisk over tid. Ved å la PC12-celler kun passere et visst antall splittinger, kan genetisk variasjon begrenses. PC12-celler uttrykker NGF-reseptorene p75^{NRT} og trkA på sine overflater, samt GR og MR (Bilderback, et al., 2001; Goto, et al., 2009). PC12-celler er dermed en god modell for å studere effekter av NGF og Dex. PC12-celler er også en god modell for å studere effekter på nevrutvekst, siden de under passende kulturforhold differensierer til nevronlignende celler og danner nevrut (Coecke, et al., 2007). Tidligere studier har demonstrert modellens gode evne til å detektere endringer i nevrutvekst induisert av Dex, NGF og en rekke kjemikalier (Jameson, et al., 2006; Radio, et al., 2008a). Effekter av Dex på nevrutvekst har tidligere blitt studert i udiffrensiererte celler, mens cellene differensierer og i differensierte celler (Jameson, et al., 2006). Ved å behandle PC12-celler med NGF, kan effekter av legemidler også studeres mens

cellene differensierer. PC12-celler utgjør et godt og enkelt system for å studere effekter på nevritutvekst, og er derfor benyttet i denne masteroppgaven.

Primære nevronkulturer består av celler som er hentet ut fra perifere eller sentrale nervesystemvev, og sådd ut på kulturskåler. Disse cellene deler mange av egenskapene til modne nevroner *in vivo*, og utvekst av nevritter skjer spontant. I motsetning til cellelinjer, kan nevrittene karakteriseres som aksoner eller dendritter (Radio, *et al.*, 2010). Dette gjør at en mer detaljert analyse av effekter på nevritutvekst kan utføres. Det er også ønskelig å benytte seg av primære nevronkulturer, siden disse nevronene er mer like nevroner *in vivo*. Cellekulturer fra hvert forsøk prepareres fra ulike dyr, og modellsystemet er derfor ikke like reproducerbart som cellelinjer. Det er en styrke dersom effekter av legemidler på nevronal utvikling kan påvises både i en cellelinje og i en primær nevronkultur. Ved å isolere kornceller fra kylling ved E18, kan nevronenes utvikling studeres siden lillehjernen fortsatt er under utvikling. Markører diskutert i avsnitt 4.2.4 – 4.2.6 kan benyttes for å studere celler som prolifererer, differensierer og migrerer. Det kan være vanskelig å utføre sammenligninger mellom korncellekulturer høstet på ulike dager i kultur, men effekter av ulike behandlinger på nevroners utvikling kan sammenlignes ved samme tidspunkt.

4.1.2 Valg av behandlinger i PC12-celler

NGF har en kjent vekstfremmende effekt på PC12-celler, og ble brukt som positiv kontroll på nevritutvekst. Dex er et legemiddel som administreres til premature barn, og tidligere studier har vist at Dex har effekter på proliferasjon, vekst og differensiering av PC12-celler (Jameson, *et al.*, 2006). Eksponering av celler for Dex ble derfor valgt for å vurdere bruken av PC12-celler som en nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi. Ara-C er et cytostatikum som ofte tilsettes primære korncellekulturer, for å gi en mer homogen nevronkultur. I disse cellekulturene kan Ara-C indusere apoptose, selektare celler som er differensierte eller starte prosesser i korncellene som gjør at de differensierer. Dette diskuteres videre i avsnitt 4.2.4 – 4.2.7. Eventuelle effekter av Ara-C på differensiering kan være av betydning for bruk av kornceller fra lillehjerne innen sikkerhetsfarmakologiske studier. Av denne grunn ble effekter av Ara-C på nevritutvekst i PC12-celler studert.

4.1.3 Morfometrisk analyse i mikroskop

Nevrittutvekst er et definert kjennetegn på nevroners morfologi, og er en viktig prosess for normal modning og funksjon. Endringer i nevrittutvekst ble derfor valgt for å studere effekter på nevronal utvikling i PC12-celler. Forsøk med PC12-celler viste at det var enklere å studere nevrittutvekst i individuelle celler over tid, sammenlignet med kornceller fra lillehjerne hos kylling. Endringer i antall celler med nevritter, antall nevritter per celle og nevrittelengder er endepunkter som tidligere har blitt brukt for å studere effekter på nevrittutvekst (Radio og Mundy, 2008b). Nevritter ble karakterisert som lange hvis de var lengre enn en gjennomsnittlig cellediameter, som ble målt til 30 μm . En gjennomsnittlig PC12-cellediameter har tidligere blitt målt til 10 μm (Ferrari, *et al.*, 2010). Dette indikerer at PC12-celler kan ha ulike morfologiske og funksjonelle egenskaper, og cellenes egenskaper kan variere mellom ulike forskningsgrupper.

I denne masteroppgaven ble effekter på nevrittutvekst studert ved en manuell metode. I PC12-celler kan nevritter enkelt telles uten at det er behov for avanserte datautstyr og dyre bildeprogrammer. Manuell måling av nevrittelengder i mikroskop kan være en tidskrevende prosess, og det kreves nøyaktighet fra analytikerens side. Metoden kan automatiseres, men det kan da være en utfordring at fasekontrastmikroskopi ikke alltid klarer å skille nevritter fra bakgrunnen (Radio og Mundy, 2008b). Dette problemet unngås ved manuell analyse siden analytikeren lett kan skille nevritter fra bakgrunnen. En observasjonsstudie er svært subjektiv, og representerer en stor feilkilde. Bevisst eller ubevisst kan analytikeren registrere effekter og egenskaper han/hun selv forventer eller ønsker å se. For å gjøre analysen mindre subjektiv kan to analytikere utføre observasjonsanalysen blindet for hverandres resultater. En større grad av sikkerhet vil oppnås hvis resultatene til de to analytikerne stemmer overens.

Områder med lik celletetthet og en spredt fordeling av celler ble valgt for å studere effekter på nevrittutvekst i mikroskop. Dette ble gjort for å ekskludere områder hvor celler ligger svært tett, og hvor det er vanskelig å studere cellenes nevritter. På dag 3 var det vanskelig å finne områder i skålen med en spredt fordeling av celler. Dette indikerer at cellene prolifererer, og øker i antall. PC12-celler deler seg

erfaringsmessig ulikt i kultur, og med ulik hastighet. Celler som ligger i nær kontakt med hverandre deler seg hurtigere enn celler som ligger alene, i motsetning til CV₁-celler som deler seg logaritmisk (Zucker, *et al.*, 1979). Det kan derfor tenkes at PC12-celler som ligger alene er selekterte celler som går ut av cellyklusen og differensierer. Dette kan i så fall utgjøre en feilkilde, siden spredte områder ble valgt.

4.1.4 Valg av metode for å måle celledød

Flere metoder kan brukes for å detektere og kvantifisere celledød. Innen nevrobiologi er spesielt fire metoder trukket frem som brukbare: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, laktat dehydrogenase (LDH) assay, merking med propidium jodid eller farging med trypanblå. Alle metodene har forlemper og ulemper, og valg av metode bør velges på bakgrunn av hvilket modellsystem som skal brukes og målet med forsøket. Et MTT-assay måler cellenes evne til å redusere MTT til et fiolett fargeprodukt, som kan måles spektrofotometrisk. Levende celler har aktive mitokondrielle enzymer som kan redusere MTT. Døde eller døende celler reduserer MTT i mindre grad fordi enzymene taper sin aktivitet. Målt absorbans vil dermed være proporsjonalt med antall levende celler (Aras, *et al.*, 2008). Ved LDH-assay måles mengden av laktat dehydrogenase enzymer i cellekulturmediet. Celledødsprosesser fører til tap av membranintegritet, og de cytoplasmiske enzymene lekker ut i mediet. Målt mengde LDH vil være proporsjonalt med antall døde celler (Aras, *et al.*, 2008). Tap av membranintegritet utgjør også bakgrunnen for bruk av propidium jodid assay og trypanblå fargeløsning assay. Propidium jodid er et fluorescerende fargestoff som farger nukleinsyrene i DNA. Fargestoffet er ikke cellepermeabelt, og trenger kun inn i døde eller skadede celler som ikke lenger har intakte cellemembraner (Aras, *et al.*, 2008). Fluorescerende celler kan telles i et fluorescensmikroskop eller kvantifiseres spektrofotometrisk. Trypanblå er et hydrofilt fargestoff, og kan ikke krysse den hydrofobe cellemembranen i levende celler med intakte cellemembraner. Døde celler har mistet sin membranintegritet, og vil ikke ekskludere fargestoffet. Fargede celler kan telles i et lysmikroskop.

Et MTT-assay kan ikke å skille mellom tap av reversibel mitokondrie-aktivitet og celledød, og kan dermed overestimere celledøden (Aras, et al., 2008). MTT har også tidligere blitt vist å være giftig for PC12-celler (Hertel, et al., 1996). Måling av celledød ved bruk av et LDH assay avhenger av cellenes størrelse, og store celler inneholder mer LDH enn mindre celler. Dette kan by på problemer siden det tidligere har blitt vist at Dex og NGF kan øke størrelsen av PC12-celler (Jameson, et al., 2006). Celler som gjennomgår apoptose beholder sin membranintegritet en viss tid ut i celledødsprosessen. Kvantifisering av LDH-løslatelse er derfor også en sen indikator på celledød ved apoptose (Loo og Rillema, 1998). Bruk av trypanblå fargeløsning er en svært brukervennlig metode, og celledøden kan kvantifiseres direkte i et mikroskop. Siden celler som gjennomgår apoptose beholder sin membranintegritet en viss tid ut i celledødsprosessen, kan metoden resultere i en underestimert celledød. I en tidligere studie hvor både MTT-assay og farging med trypanblå ble brukt for å kvantifisere celledød i PC12-celler, ble det vist en god korrelasjon mellom resultatene fra de to metodene (Koh, et al., 2005). Trypanblå assay er en mer subjektiv metode enn de andre teknikkene. Til gjengjeld gir metoden morfologisk informasjon om cellene, og tap av membranintegritet er en irreversibel prosess som representerer et godt endepunkt. I tidligere studier er farging med trypanblå og propidium jodid assay mye benyttet for å kvantifisere celledød i PC12-celler (Das, et al., 2004; Jameson, et al., 2006). Dette er begge egnede metoder som også kan automatiseres. I denne masteroppgaven skulle celledøden kvantifiseres for å kontrollere om ulike behandlinger gav celledød, og farging med trypanblå var en enkel og hurtig metode. I tillegg kan celledøden kvantifiseres i et lysmikroskop, i motsetning til et propidium jodid assay hvor et fluorescensmikroskop eller en plateleser er nødvendig.

4.1.5 Westernblotting

Westernblotting er en etablert metode for å identifisere og lokalisere proteiner på bakgrunn av deres egenskap til å binde spesifikke antistoffer (Towbin, et al., 1979). I denne oppgaven er α tubulin, β -aktin og kjerneproteinet lamin brukt som intern standard. α tubulin og β -aktin er de mest brukte interne standardene ved westernblotting. Aktin og tubulin er bestanddeler i cellens cytoskjelett, og spiller en viktig rolle for vekst av nevritter (Dent og Gertler, 2003). Ved nevritutvekst

organiseres mikrotubulus til kompakte kjeder, som strekker seg fra cellekroppen og ut gjennom hele nevritten. I nevrittens "growth cone" stimulerer økte nivåer av β -aktin til bevegelse (Zhang, et al., 2001). Det kan tenkes at nivået av α tubulin og β -aktin vil øke over tid, som et resultat av at korncellene stadig danner flere og lengre nevritter. α tubulin og β -aktin vil i så fall kunne benyttes som differensieringsmarkører. I korncellekulturer som ikke er behandlet med Ara-C, vil også astrocytter kunne bidra til økt mengde α tubulin eller β -aktin. Økte nivåer av α tubulin eller β -aktin kan føre til et underestimert nivå av proteinene, når mengde protein i prøvene korrigeres for. I denne masteroppgaven ble korncellekulturer høstet på ulike dager i kultur, og det ble observert at mengde α tubulin og β -aktin økte over tid. Figur 3.25 og 3.28 er eksempler på dette. Kjerneproteinet lamin ble benyttet i to av westernblotting-analysene. Det kan hende at lamin egner seg bedre som intern standard når korncellekulturer skal høstes på ulike dager i kultur. I westernblotting-analyser av PC12-celler, ble cellene kun høstet ved ett tidspunkt. Bruk av α tubulin eller β -aktin som intern standard i dette tilfellet vil derfor trolig ikke utgjøre en stor feilkilde.

Forsøk med westernblotting viste at bruk av maksimalt eller gjennomsnittlig antall piksler for å måle proteinenes båndstyrke i ImageJ, hadde sammenheng med kvaliteten av blottene. Maksimalt antall piksler ble brukt for blott med lite bakgrunn, og gjennomsnittlig antall piksler ble brukt for blott med mye bakgrunn. Dette samsvarte best med hva blottene viste visuelt.

4.2 Diskusjon av biologiske funn

4.2.1 Dex gir økte nevrittelengder via en GR-mediert signalvei i PC12-celler

Dex arresterer celler i G_1 -/ G_0 -fase i cellyklusen (Greenberg, et al., 2002). Denne effekten står for Dex sin terapeutiske effekt i umodne lunger, ved at pneumocytter slutter å dele seg og differensierer til surfaktant-produserende celler (Gross, 1990). Eksponering av PC12-celler for Dex hadde ingen effekt på antall nevritter, men gav en tidsavhengig økning av nevrittelengder (figur 3.2). Sammenlignet med NGF, gav Dex like mange lange nevritter. I en tidligere studie fra hippocampus hos rotte ble det

vist at Dex hemmer nevronal proliferasjon *in vivo* og *in vitro* (J. B. Kim, *et al.*, 2004). Dette tyder på at celler går ut at cellyklusen i respons til Dex, og differensierer. Administrering av Dex prenatalt kan dermed føre til færre nevroner og endret strukturell plastisitet. Studien demonstrerer at nevrittelengder er et robust endepunkt for å studere effekter på nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler er også en god modell for å studere effekter av Dex på nevronal utvikling, og kan brukes til å studere effekter av andre legemidler på nevruttvekst.

Mekanismer for nevruttvekst induisert av Dex, ble studert ved bruk av GR antagonist mifepriston og MR antagonist RU28318. Effekter av Dex på nevrittelengder ble hemmet av mifepriston, men ikke av RU28318 (figur 3.8 C og D). Mifepriston er en potent GR antagonist, men har også høy affinitet for progesteronreseptoren (PR) og svak affinitet for androgenreseptoren (AR). Terapeutisk benyttes mifepriston for å avslutte uønsket graviditet. Ved å blokkere effekter av progesteron, induseres sammentrekninger av livmoren (Brogden, *et al.*, 1993). Tidligere studier i rotte og menneske har vist at mifepriston binder GR med tre ganger høyere affinitet sammenlignet med Dex, og at mifepriston effektivt blokkerer gentranskripsjon induisert av glukokortikoider (Agarwai, 1996; Kawai, *et al.*, 1987). Siden mifepriston ikke har affinitet for MR, er den sannsynlige effekten på Dex-indusert nevruttvekst en blokkering av GR. RU28318 er en potent MR antagonist, men har også affinitet for GR (P. J. Kim, *et al.*, 1998). En tidligere studie i hippocampus fra rotte viste at RU28318 binder GR med femti ganger lavere affinitet sammenlignet med MR (Bitran, *et al.*, 1998). Selv om RU28318 har affinitet for GR, hemmet den ikke effekter av Dex i denne studien ved den anvendte konsentrasjonen (10 μ M). Dette indikerer at effekter av Dex på nevruttvekst er induisert via en GR-mediert signalvei i PC12-celler. Effekter medierte via GR er tidligere beskrevet som en klassisk/genregulatorisk effekt av Dex. Dex har også blitt vist å indusere apoptose i kornceller fra lillehjerne hos rotte (Jacobs, Trinh, *et al.*, 2006). MR antagonist RU28318 reduserte den Dex-induserte (10 μ M) celledøden med 80 %. Dette ble foreslått som en rask, ikke-klassisk effekt av Dex, medierte via en GR/MR signalvei styrt av membranreseptorer (Jacobs, Trinh, *et al.*, 2006).

4.2.2 Ara-C påvirker nevrittlengder i PC12-celler

Ara-C arresterer celler i G₁-fase, og hindrer cellenes progresjon gjennom cellesyklusen (Freemerman, *et al.*, 1997). PC12-celler er kreftceller, og vil kontinuerlig fortsette å dele seg. Det var derfor forventet at behandling med Ara-C ville sende alle cellene i apoptose. Etter 72 timer var derimot 10 % av cellene fortsatt viable (figur 3.6). Ara-C hadde ingen effekt på antall nevritter i PC12-celler, men gav en tendens til økte nevrittlengder (figur 3.5). I PC12-celler behandlet med Ara-C ble det observert nevrittlengder som ikke var å finne i ubehandlede celler (figur 3.4). Dette indikerer at Ara-C ikke bare selekterer celler som er differensierte, men at Ara-C selv kan sende celler ut av cellesyklus slik at de differensierer. For å bekrefte eller avkrefte dette kan det gjøres forsøk hvor enkeltceller følges over tid med et kamera. Det kan da undersøkes om celler som overlever Ara-C-behandling er celler som allerede har nevritter, eller om enhver celle kan sendes ut av cellesyklus og differensiere i respons til Ara-C. Kanskje er det slik at celler med korte nevritter går inn igjen i cellesyklusen, og sendes i apoptose. I tillegg til at Ara-C gav økte nevrittlengder, hemmet den også proliferasjonen av celler (figur 3.6). Legemidler som har effekt på celleproliferasjon vil dermed ikke plukkes opp ved bruk av Ara-C i kornceller fra lillehjerne.

4.2.3 Caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak NGF-indusert nevrittutvekst i PC12-celler

Caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk gav en forsinket NGF-indusert nevrittutvekst i PC12-celler, med færre og kortere nevritter etter 24 og 48 timer (figur 3.13). Effekten så ut til å være midlertidig, og det var ingen forskjell i verken antall nevritter eller nevrittlengder etter 72 timer sammenlignet med effekter av NGF alene. Reeksponering av PC12-celler med z-DEVD-cmk 48 timer etter at cellene hadde blitt behandlet med NGF og z-DEVD-cmk, gav ingen ytterligere effekt. Dette kan tyde på at andre mekanismer har tatt over, og at de overgår den hemmende effekten av z-DEVD-cmk. Caspase-3 spiller således en rolle for mekanismene bak nevrittutvekst indusert av NGF på et tidlig stadium. Caspase-3-assay viste at caspase-3-aktiviteten var lav for celler eksponert for NGF (figur 3.9). Det kan tenkes at kun lave nivåer av caspase-3 er nødvendig for å indusere nevrittutvekst, eller at caspase-3 kan ha

lokale effekter. Det skal derimot understrekes at dette var et pilotforsøk, og flere forsøk må utføres for å bekrefte eller avkrefte dette. Det kan også utføres immunfarging, for å finne ut hvor i cellene caspase-3 er lokalisert.

Celleadhesjons-molekyler (CAM) er viktige regulatorer av nevroners differensiering og nevrutvekst. CAM regulerer rearrangeringer av cytoskjelettet via intracellulære signalveier. Nevronal celleadhesjons-molekyl (NCAM) uttrykkes av nevroner under utvikling, og eksisterer som flere transmembrane isofomer (Maness og Schachner, 2007). I en nyere studie fra hippocampus hos mus ble det vist at NCAM regulerer aktiviteten av caspase-8, som kløyver og aktiverer caspase-3. Caspase-3 fører deretter til en lokal rearrangering av spektrin i cytoskjelettet. Studien viste også at hemmere av caspase-8 og caspase-3 blokkerte nevrutvekst induert av NCAM (Westphal, *et al.*, 2010). Denne studien indikerer at NCAM kan regulere dannelse av nevrer via en lokal caspase-aktivitet. Det har tidligere blitt vist at NGF øker uttrykket av NCAM i PC12-celler (Prentice, *et al.*, 1987). Det hadde vært interessant å undersøke om effekter av caspase-3-hemmer på NGF-indusert nevrutvekst observert i denne studien, involverer NCAM. For å studere NCAMs involvering i NGF-indusert nevrutvekst, kan NCAM-nivået reduseres ved bruk av SiRNA. En caspase-8-hemmer kan også brukes for å undersøke om NCAM er involvert. Det vil da forventes at hemming av caspase-8-aktivitet vil redusere nevrutvekst induert av NGF.

4.2.4 PCNA som proliferasjonsmarkør i korncellekulturer, og effekter av Ara-C

PCNA er et protein som spiller en viktig rolle for reparasjon og replikasjon av DNA. PCNA befinner seg inne i cellekjernen, hvor det fungerer som et bindeledd mellom DNA og enzymet DNA-polymerase. PCNA uttrykkes av celler i S-fase, og er derfor en god markør på at celler befinner seg i celledyklusen og er under deling (Paunesku, *et al.*, 2001). Uttrykket av PCNA var størst på DIV 2 både for celler behandlet med og uten Ara-C, og ble redusert på DIV 4 og DIV 6 (figur 3.22). Dette indikerer at det er flere celler i deling ved DIV 2, både kornceller og astrocytter. Ara-C reduserte uttrykket av PCNA på DIV 2 sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.22). Det har tidligere blitt vist at tilsats av Ara-C tidlig i kultur gir økt basaldød

sammenlignet med korncellekulturer som ikke er behandlet med Ara-C (Jacobs, Aden, *et al.*, 2006). Dette kan komme av at Ara-C er toksisk for kornceller, eller at astrocytter har en beskyttende effekt på kornceller. I kornceller fra rotte er det vist at tilsats av Ara-C på samme dag som cellene prepareres induserer apoptose. Ingen effekt er observert når Ara-C tilsettes kulturene 24 og 48 timer etter utplating (Leeds, *et al.*, 2005). Dette kan tyde på at det fortsatt er en subpopulasjon av kornceller som befinner seg i cellesyklus på DIV 1 når Ara-C tilsettes kulturene. Hvis det er slik at subpopulasjoner av kornceller dør ved tilsats av Ara-C, kan dette representere en stor feilkilde i sikkerhetsfarmakologiske studier. Disse korncellene kan være av en type nevroner som er spesielt sårbare for Dex eller andre legemidler, og dette vil dermed ikke plukkes opp. PCNA er ikke nevrospesifikt, og for å skille mellom uttrykket av PCNA i kornceller og astrocytter bør immunfarging utføres. Immunfarging har tidligere vist at 20 % av nevronene er PCNA-positive uten Ara-C, og 5 % med Ara-C (Aden, 2011, manuskript). PCNA er således en god markør for å studere effekter av legemidler på korncellers proliferasjon.

4.2.5 NeuN som differensieringsmarkør i kornceller, og effekter av Ara-C

NeuN er et nevrospesifikt protein, og uttrykkes av kornceller etter at de har forlatt cellesyklus og er ferdig med å dele seg (Mullen, *et al.*, 1992). NeuN ble nylig identifisert som Fox-3, en komponent i nevrons kjernematriks som regulerer uttrykket av nevrospesifikke gener. NeuN bindes til spesifikke sekvenser på RNA, og regulerer alternativ mRNA spleising (K. K. Kim, *et al.*, 2010). I lillehjernen hos mennesker har det tidligere blitt vist at kornceller i det ytre korncellelaget er mer immunreaktive mot NeuN enn kornceller i det indre korncellelaget (Sarnat, *et al.*, 1998). I lillehjernen hos mus uttrykkes NeuN kun av kornceller (Weyer og Schilling, 2003). Uttrykket av NeuN kan dermed si noe om cellenes modningsgrad. Uttrykket av NeuN var størst på DIV 2 både for celler behandlet med og uten Ara-C, og ble redusert på DIV 4 og DIV 6 (figur 2.24). At uttrykket av NeuN faller i kultur kan indikere at cellene faller av skålen, eller at de differensierer til celler tilsvarende postmigrerte celler i det indre korncellelaget *in vivo*. Tilsats av Ara-C til korncellekulturene reduserte uttrykket av NeuN på DIV 2, sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt (figur 3.24 B). Dersom det er slik at umodne kornceller uttrykker NeuN-proteinet i høyere grad, kan dette tyde på at Ara-C

påvirker cellene slik at de differensierer. For å ta hensyn til antall og type celler, bør det utføres immunfarging. Uttrykket av NeuN kan da presenteres som prosent NeuN-positive celler. Det har tidligere blitt vist at korncellekulturer fra kylling som ikke er behandlet med Ara-C, har 45 % NeuN-positive celler på DIV 3. Når de tilsettes Ara-C er 70-80 % av cellene NeuN-positive (Jacobs, Aden, *et al.*, 2006). NeuN er således en god markør for å studere effekter av legemidler på korncellers differensiering.

4.2.6 Pax 6 som markør for migrerende kornceller, og effekter av Ara-C

Pax 6 er et protein som bindes til spesifikke sekvenser på DNA, og regulerer transkripsjonen av gener som er viktige for nevronal migrering og nevrutvekst (Chung, *et al.*, 2010). I Pax 6-muterte rotter danner ikke kornceller i det ytre korncellelaget aksoner, og migreringen hemmes (Yamasaki, *et al.*, 2001). I lillehjerne hos mus uttrykkes Pax 6 av forløperceller i rhombic lip, og av kornceller i det ytre korncellelaget. I modne kornceller i det indre korncellelaget reduseres uttrykket av Pax 6 (Swanson, *et al.*, 2005). Uttrykket av Pax 6 kan dermed si noe om hvilket utviklingsstadium korncellene befinner seg i. Det er viktig å bekrefte at kornceller fra lillehjerne hos kylling også uttrykker Pax 6. Uttrykket av Pax 6 var størst på DIV 2 både for celler behandlet med og uten Ara-C, og ble redusert på DIV 4 og DIV 6 (figur 3.26). Uttrykket av Pax 6 falt fortere i kultur enn uttrykket av NeuN (figur 3.24, 3.26 og 3.27). Dette kan indikere at proteinnivået av Pax 6 per celle har gått ned, eller at uttrykket av Pax 6 er lavere enn NeuN. Kanskje er det slik at celler som uttrykker Pax 6 selekteres, og faller fortere av skålen enn celler som uttrykker NeuN. For å undersøke om Pax 6 og NeuN uttrykkes av ulike cellepopulasjoner, kan dobbelt-immunfarging gjennomføres.

Tilsats av Ara-C til korncellekulturene reduserte uttrykket av Pax 6 på DIV 2, sammenlignet med ubehandlede celler ved samme tidspunkt (figur 2.26 B). Dette kan indikere at cellene differensierer tilsvarende postmigrerte celler i det indre korncellelaget *in vivo*. Pax 6 uttrykkes av celler både i det indre og det ytre korncellelaget, og det kan derfor være ønskelig å benytte antigener som uttrykkes mer restriktivt over tid. Math-1 antas å være viktig for korncellenes differensiering, og uttrykkes av forløperceller i rhombic lip og av prolifererende kornceller i det ytre korncellelaget (Gazit, *et al.*, 2004).

4.2.7 NR2A og NR2B som utviklingsmarkører i kornceller, og effekter av Ara-C

I kornceller fra lillehjerne hos rotte og mus er det beskrevet en "developmental switch", hvor uttrykket av NMDA-reseptorsubenheten NR2A øker, mens uttrykket av NR2B synker (Fu, *et al.*, 2005; Liu, *et al.*, 2004; Mancini og Atchison, 2007). Det har ikke blitt vist at et slik bytte i NMDA-reseptorsubenheter finner sted i kornceller fra lillehjerne hos kylling, og på hvilket tidspunkt under utviklingen et slikt bytte eventuelt finner sted. Uttrykket av NR2A var størst på DIV 2 både for celler behandlet med og uten Ara-C, og ble redusert på DIV 4 og DIV 6 (figur 3.29 B). Dette kan derimot være et resultat av at α tubulin og β -aktin økte over tid (figur og 3.28). Ukorrigert for proteinmengde viste den grafiske fremstillingen en topp på DIV 4 for celler behandlet med Ara-C (figur 3.29 A).

Uttrykket av NR2B var varierende fra DIV 2 til DIV 6 (figur 3.31 B). Ukorrigert for proteinmengde var uttrykket av NR2B størst på DIV 6, både for celler behandlet med og uten Ara-C. (figur 3.31 A). Det var derimot høye standardfeil. NR2B uttrykkes i høyere grad av kornceller under embryonal og neonatal fase, når cellene migrerer fra lillehjernebarkens ytre til indre lag (Snell, *et al.*, 2001). At NR2B uttrykkes på alle tidspunkter i kultur, kan indikere at det fortsatt er en subpopulasjon av kornceller som befinner seg på et stadium som tilsvarer migrasjonsfasen.

Forholdet mellom NR2A og NR2B endres over tid, både for celler behandlet med og uten Ara-C (figur 3.32). På DIV 2 ser det ut som uttrykket av NR2A er høyere enn NR2B. Dette er et uventet funn, siden det forventes at uttrykket av NR2A vil øke over tid. Uttrykket av NR2A og NR2B var varierende mellom ulike forsøk, og er en svakhet for forsøkene. Det bør derfor utføres flere paralleller for å kunne si noe om hvordan NMDA-reseptorsubenhetene forandrer seg når kornceller utvikles i kultur. Utvikling av gode positive og negative kontroller er også viktig. Flere antistoffer rettet mot NMDA-reseptorsubenhetene bør testes ut, for å sikre at antistoffene faktisk detekterer NR2A- og NR2B-subenheterne i kornceller fra kylling. Korncellekulturer kan også høstes etter DIV 6, for å undersøke om en "developmental switch" kan påvises senere i utviklingen. Det kan se ut som ulike subpopulasjoner av celler befinner seg på ulike stadier i utviklingen, og at de uttrykker ulike NMDA-reseptorsubenheter. For å

studere hvilke celler som uttrykker de ulike subenhetene under utviklingen, kan immunfarging gjennomføres.

4.2.8 Veien videre

Det har tidligere blitt vist at GR uttrykkes av kornceller fra lillehjerne hos kylling, og at Dex induserer apoptose i kornceller fra kylling både *in vivo* og *in vitro* (Aden, *et al.*, 2008). Kloning av GR hos kylling har vist 73 % likhet sammenlignet med GR hos mennesker (NuclearReceptorsNomenclatureCommittee, 1999). Dette gjør kornceller fra lillehjerne hos kylling til en god modell for å studere effekter av Dex på nevronal utvikling. Analyse av korncellenes morfologiske utvikling av nevritter over tid var vanskelig å studere i et mikroskop. "High content screening"-metoder gjør det mulig å analysere nevritutvekst på en automatisert metode. Dette krever derimot dyre data- og bildebehandlingsprogrammer. Ved bruk av PCNA, NeuN og Pax 6 som markører for celler som prolifererer, differensierer og migrerer, kan effekter av Dex på nevronal utvikling studeres. Modellen kan også brukes til å studere effekter av legemidler som påvirker nevroners eksitabilitet. Legemidler som er aktuelle å bruke under svangerskapet, som antiepileptiske og antidepressive legemidler, vil være av interesse. Effekter av Dex og andre legemidler på nevronal utvikling kan også studeres ved bruk av lillehjerneskliver fra kylling *ex vivo*. Ved å transfektere hjernesklivene med et fluorescerende protein, kan korncellenes migrering fra lillehjernes ytre til indre lag følges. Denne metoden har tidligere blitt brukt i lillehjerne hos mus (Famulski, *et al.*, 2010). Sammenlignet med *in vitro* metoder, reflekterer lillehjerneskliver nevronenes utvikling *in vivo* i høyere grad.

5. Konklusjon

- Nevrittlengder er et robust endepunkt for å studere effekter på nevrutvekst i PC12-celler. Dex induserer økte nevruttlengder i PC12-celler via en GR-mediert effekt. PC12-celler er en enkel og god modell for å studere effekter av legemidler på nevrutvekst, og kan benyttes innen sikkerhetsfarmakologiske studier.
- Caspase-3 er involvert i mekanismene for NGF-indusert, men ikke Dex-indusert, nevrutvekst i PC12-celler.
- PCNA, Pax 6 og NeuN kan benyttes som markører i kornceller fra lillehjerne hos kylling, for å studere effekter av Dex og andre legemidler på nevronal utvikling.
- Ara-C påvirker uttrykket av PCNA, NeuN og Pax 6 i kornceller fra lillehjerne hos kylling. I et sikkerhetsfarmakologisk perspektiv bør det undersøkes videre om Ara-C kan virke forstyrrende for legemiddeltesting i korncellekulturer fra lillehjerne.

Kildeliste

- Aden, P., Goverud, I., Liestol, K., Loberg, E. M., Paulsen, R. E., Maehlen, J., *et al.* (2008). Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum. *Brain Res*, 1236, 39-48.
- Agarwai, M. K. (1996). The antiglucocorticoid action of mifepristone. *Pharmacol Ther*, 70(3), 183-213.
- Almeida, O. F., Conde, G. L., Crochemore, C., Demeneix, B. A., Fischer, D., Hassan, A. H., *et al.* (2000). Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J*, 14(5), 779-790.
- Aras, M. A., Hartnett, K. A., og Aizenman, E. (2008). Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 7, Unit 7* 18.
- Aziz, G., Akselsen, O. W., Hansen, T. V., og Paulsen, R. E. (2010). Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 247(3), 238-242.
- Baillieux, H., De Smet, H. J., Paquier, P. F., De Deyn, P. P., og Marien, P. (2008). Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. *Clin Neurol Neurosurg*, 110(8), 763-773.
- Baker, M. E. (2001). Adrenal and sex steroid receptor evolution: environmental implications. *J Mol Endocrinol*, 26(2), 119-125.
- Bartkowska, K., Turlejski, K., og Djavadian, R. L. (2010). Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 70(4), 454-467.
- Benediktsson, R., Calder, A. A., Edwards, C. R., og Seckl, J. R. (1997). Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46(2), 161-166.
- Berger-Sweeney, J., og Hohmann, C. F. (1997). Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav Brain Res*, 86(2), 121-142.
- Bilderback, T. R., Gazula, V. R., og Dobrowsky, R. T. (2001). Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem*, 76(5), 1540-1551.
- Bitran, D., Shiekh, M., Dowd, J. A., Dugan, M. M., og Renda, P. (1998). Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 60(4), 879-887.

- Black, M. M., Aletta, J. M., og Greene, L. A. (1986). Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 103(2), 545-557.
- Bloch, A., og Thoenen, H. (1996). Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 7(3), 173-190.
- Bloom, S. L., Sheffield, J. S., McIntire, D. D., og Leveno, K. J. (2001). Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol*, 97(4), 485-490.
- Bolt, R. J., van Weissenbruch, M. M., Lafeber, H. N., og Delemarre-van de Waal, H. A. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol*, 32(1), 76-91.
- Brogden, R. N., Goa, K. L., og Faulds, D. (1993). Mifepristone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*, 45(3), 384-409.
- Carletti, B., og Rossi, F. (2008). Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist*, 14(1), 91-100.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., *et al.* (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873), 793-798.
- Chung, S. H., Kim, C. T., Jung, Y. H., Lee, N. S., og Jeong, Y. G. (2010). Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anat Cell Biol*, 43(1), 86-95.
- Chuong, C. M., Crossin, K. L., og Edelman, G. M. (1987). Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers. *J Cell Biol*, 104(2), 331-342.
- Coecke, S., Goldberg, A. M., Allen, S., Buzanska, L., Calamandrei, G., Crofton, K., *et al.* (2007). Workgroup report: incorporating in vitro alternative methods for developmental neurotoxicity into international hazard and risk assessment strategies. *Environ Health Perspect*, 115(6), 924-931.
- Contestabile, A. (2002). Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, 1(1), 41-55.
- Crochemore, C., Michaelidis, T. M., Fischer, D., Loeffler, J. P., og Almeida, O. F. (2002). Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *FASEB J*, 16(8), 761-770.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., og Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3), 327-335.

- Dahl, O., Lehne, G., Baksaas, I., Kvaløy, S., og Christoffersen, T. (2009). *Cytostatikaboken, medikamentell kreftbehandling* (7 ed.). Oslo: Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo.
- Das, K. P., Freudenrich, T. M., og Mundy, W. R. (2004). Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol Teratol*, 26(3), 397-406.
- Dehmelt, L., og Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol*, 58(1), 18-33.
- Dent, E. W., og Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), 209-227.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M., og Kirschner, M. W. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol*, 101(5 Pt 1), 1799-1807.
- Ernfors, P., Merlio, J. P., og Persson, H. (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur J Neurosci*, 4(11), 1140-1158.
- Espinosa, J. S., og Luo, L. (2008). Timing neurogenesis and differentiation: insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 28(10), 2301-2312.
- Famulski, J. K., Trivedi, N., Howell, D., Yang, Y., Tong, Y., Gilbertson, R., *et al.* (2010). Siah regulation of Pard3A controls neuronal cell adhesion during germinal zone exit. *Science*, 330(6012), 1834-1838.
- Farrant, M., Feldmeyer, D., Takahashi, T., og Cull-Candy, S. G. (1994). NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*, 368(6469), 335-339.
- Ferrari, A., Faraci, P., Cecchini, M., og Beltram, F. (2010). The effect of alternative neuronal differentiation pathways on PC12 cell adhesion and neurite alignment to nanogratings. *Biomaterials*, 31(9), 2565-2573.
- Ferrero, S., Pretta, S., og Ragni, N. (2004). Multiple sclerosis: management issues during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 115(1), 3-9.
- Frade, J. M., og Barde, Y. A. (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays*, 20(2), 137-145.
- Freemerman, A. J., Vrana, J. A., Tombes, R. M., Jiang, H., Chellappan, S. P., Fisher, P. B., *et al.* (1997). Effects of antisense p21 (WAF1/CIP1/MDA6) expression on the induction of differentiation and drug-mediated apoptosis in human myeloid leukemia cells (HL-60). *Leukemia*, 11(4), 504-513.

- French, N. P., Hagan, R., Evans, S. F., Mullan, A., og Newnham, J. P. (2004). Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol*, 190(3), 588-595.
- Fu, Z., Logan, S. M., og Vicini, S. (2005). Deletion of the NR2A subunit prevents developmental changes of NMDA-mEPSCs in cultured mouse cerebellar granule neurones. *J Physiol*, 563(Pt 3), 867-881.
- Fujita, K., Lazarovici, P., og Guroff, G. (1989). Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environ Health Perspect*, 80, 127-142.
- Fuller, P. J., og Young, M. J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46(6), 1227-1235.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., og Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065), 185-192.
- Gazit, R., Krizhanovsky, V., og Ben-Arie, N. (2004). Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development*, 131(4), 903-913.
- Goto, J., Otsuka, F., Yamashita, M., Suzuki, J., Otani, H., Takahashi, H., *et al.* (2009). Enhancement of aldosterone-induced catecholamine production by bone morphogenetic protein-4 through activating Rho and SAPK/JNK pathway in adrenomedullar cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(4), E904-916.
- Greenberg, A. K., Hu, J., Basu, S., Hay, J., Reibman, J., Yie, T. A., *et al.* (2002). Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27(3), 320-328.
- Greene, L. A., og Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(7), 2424-2428.
- Greidinger, E. L., Miller, D. K., Yamin, T. T., Casciola-Rosen, L., og Rosen, A. (1996). Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett*, 390(3), 299-303.
- Gross, I. (1990). Regulation of fetal lung maturation. *Am J Physiol*, 259(6 Pt 1), L337-344.
- Hack, M., og Fanaroff, A. A. (1999). Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990's. *Early Hum Dev*, 53(3), 193-218.
- Hamburger, V., og Levi-Montalcini, R. (1949). Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, 111(3), 457-501.

- Heine, V. M., og Rowitch, D. H. (2009). Hedgehog signaling has a protective effect in glucocorticoid-induced mouse neonatal brain injury through an 11betaHSD2-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 119(2), 267-277.
- Hertel, C., Hauser, N., Schubengel, R., Seilheimer, B., og Kemp, J. A. (1996). Beta-amyloid-induced cell toxicity: enhancement of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-dependent cell death. *J Neurochem*, 67(1), 272-276.
- Holtzman, D. M., Kilbridge, J., Li, Y., Cunningham, E. T., Jr., Lenn, N. J., Clary, D. O., et al. (1995). TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci*, 15(2), 1567-1576.
- Huard, J. M., Forster, C. C., Carter, M. L., Sicinski, P., og Ross, M. E. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development*, 126(9), 1927-1935.
- ICH57A. (2001). International Conference on Harmonisation; guidance on S7A safety pharmacology studies for human pharmaceuticals; availability. Notice. *Fed Regist*, 66(135), 36791-36792.
- Jacobs, C. M., Aden, P., Mathisen, G. H., Khuong, E., Gaarder, M., Loberg, E. M., et al. (2006). Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture. *J Neurosci Methods*, 156(1-2), 129-135.
- Jacobs, C. M., Trinh, M. D., Rootwelt, T., Lomo, J., og Paulsen, R. E. (2006). Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg²⁺ in cerebellar granule neurons. *Brain Res*, 1070(1), 116-123.
- Jameson, R. R., Seidler, F. J., Qiao, D., og Slotkin, T. A. (2006). Adverse neurodevelopmental effects of dexamethasone modeled in PC12 cells: identifying the critical stages and concentration thresholds for the targeting of cell acquisition, differentiation and viability. *Neuropsychopharmacology*, 31(8), 1647-1658.
- Kamath, K., Oroudjev, E., og Jordan, M. A. (2010). Determination of microtubule dynamic instability in living cells. *Methods Cell Biol*, 97, 1-14.
- Kapoor, A., Petropoulos, S., og Matthews, S. G. (2008). Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev*, 57(2), 586-595.
- Kawai, S., Nieman, L. K., Brandon, D. D., Udelsman, R., Loriaux, D. L., og Chrousos, G. P. (1987). Pharmacokinetic properties of the antiglucocorticoid and antiprogestosterone steroid RU 486 in man. *J Pharmacol Exp Ther*, 241(2), 401-406.
- Kim, J. B., Ju, J. Y., Kim, J. H., Kim, T. Y., Yang, B. H., Lee, Y. S., et al. (2004). Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Res*, 1027(1-2), 1-10.

- Kim, K. K., Kim, Y. C., Adelstein, R. S., og Kawamoto, S. (2010). Fox-3 and PSF interact to activate neural cell-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*
- Kim, P. J., Cole, M. A., Kalman, B. A., og Spencer, R. L. (1998). Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67(3), 213-222.
- Koh, S. H., Kwon, H., Park, K. H., Ko, J. K., Kim, J. H., Hwang, M. S., *et al.* (2005). Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 133(2), 176-186.
- Komuro, H., og Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260(5104), 95-97.
- Komuro, H., og Rakic, P. (1996). Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, 17(2), 275-285.
- Komuro, H., og Rakic, P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci*, 18(4), 1478-1490.
- Komuro, H., og Yacubova, E. (2003). Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol Life Sci*, 60(6), 1084-1098.
- Komuro, H., Yacubova, E., og Rakic, P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci*, 21(2), 527-540.
- Leeds, P., Leng, Y., Chalecka-Franaszek, E., og Chuang, D. M. (2005). Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons. *Neurochem Int*, 46(1), 61-72.
- Liu, X. B., Murray, K. D., og Jones, E. G. (2004). Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci*, 24(40), 8885-8895.
- Loo, D. T., og Rillema, J. R. (1998). Measurement of cell death. *Methods Cell Biol*, 57, 251-264.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., og Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 434-445.
- Ma, J., Yu, Z., Qu, W., Tang, Y., Zhan, Y., Ding, C., *et al.* (2010). Proliferation and differentiation of neural stem cells are selectively regulated by knockout of cyclin D1. *J Mol Neurosci*, 42(1), 35-43.
- Mancini, J. D., og Atchison, W. D. (2007). The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration. *Neurosci Lett*, 429(2-3), 87-90.

- Maness, P. F., og Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, 10(1), 19-26.
- McEwen, B. S. (1987). Steroid hormones and brain development: some guidelines for understanding actions of pseudohormones and other toxic agents. *Environ Health Perspect*, 74, 177-184.
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., *et al.* (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*, 18(1-2), 49-72.
- Moe, L. K. (2010). *Procaspase-Activating Compound-1 (PAC-1)-Effekter på celledød og caspaseaktivitet i cellelinjen PC12 og kyllingkornceller*. Universitetet i Oslo, Oslo.
- Monnet, F. P., og Maurice, T. (2006). The sigma1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. *J Pharmacol Sci*, 100(2), 93-118.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., og Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-540.
- Morsink, M. C., Joels, M., Sarabdjitsingh, R. A., Meijer, O. C., De Kloet, E. R., og Datson, N. A. (2006). The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. *J Neurochem*, 99(4), 1282-1298.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., og Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.
- Murphy, B. P., Inder, T. E., Huppi, P. S., Warfield, S., Zientara, G. P., Kikinis, R., *et al.* (2001). Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics*, 107(2), 217-221.
- Newnham, J. P., Evans, S. F., Godfrey, M., Huang, W., Ikegami, M., og Jobe, A. (1999). Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restricts fetal growth. *J Matern Fetal Med*, 8(3), 81-87.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6(11), 1028-1042.
- Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., og Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*, 75(1), 1-12.
- NuclearReceptorsNomenclatureCommittee. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97(2), 161-163.

- Numachi, Y., Yoshida, S., Toda, S., Matsuoka, H., og Sato, M. (2000). Two inbred strains of rats, Fischer 344 and Lewis, showed differential behavior and brain expression of corticosterone receptor mRNA induced by methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci*, 914, 33-45.
- O'Shea, T. M., Kothadia, J. M., Klinepeter, K. L., Goldstein, D. J., Jackson, B. G., Weaver, R. G., 3rd, *et al.* (1999). Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. *Pediatrics*, 104(1 Pt 1), 15-21.
- Oakley, R. H., og Cidlowski, J. A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 286(5), 3177-3184.
- Ohnuma, S., og Harris, W. A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron*, 40(2), 199-208.
- Oomman, S., Finckbone, V., Dertien, J., Attridge, J., Henne, W., Medina, M., *et al.* (2004). Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis. *J Comp Neurol*, 476(2), 154-173.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Dertien, J., og Strahlendorf, J. (2006). Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. *Brain Res*, 1078(1), 19-34.
- Owen, D., og Matthews, S. G. (2003). Glucocorticoids and sex-dependent development of brain glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*, 144(7), 2775-2784.
- Paoletti, P., og Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7(1), 39-47.
- Parikh, N. A., Lasky, R. E., Kennedy, K. A., Moya, F. R., Hochhauser, L., Romo, S., *et al.* (2007). Postnatal dexamethasone therapy and cerebral tissue volumes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*, 119(2), 265-272.
- Paunesku, T., Mittal, S., Protic, M., Oryhon, J., Korolev, S. V., Joachimiak, A., *et al.* (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*, 77(10), 1007-1021.
- Prentice, H. M., Moore, S. E., Dickson, J. G., Doherty, P., og Walsh, F. S. (1987). Nerve growth factor-induced changes in neural cell adhesion molecule (N-CAM) in PC12 cells. *EMBO J*, 6(7), 1859-1863.
- Pugsley, M. K. (2005). Methodology used in safety pharmacology: appraisal of the state-of-the-art, the regulatory issues and new directions. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 52(1), 1-5.

- Quartu, M., Serra, M. P., Manca, A., Follesa, P., Ambu, R., og Del Fiacco, M. (2003). High affinity neurotrophin receptors in the human pre-term newborn, infant, and adult cerebellum. *Int J Dev Neurosci*, 21(6), 309-320.
- Radio, N. M., Breier, J. M., Shafer, T. J., og Mundy, W. R. (2008a). Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening. *Toxicol Sci*, 105(1), 106-118.
- Radio, N. M., Freudenrich, T. M., Robinette, B. L., Crofton, K. M., og Mundy, W. R. (2010). Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis. *Neurotoxicol Teratol*, 32(1), 25-35.
- Radio, N. M., og Mundy, W. R. (2008b). Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology*, 29(3), 361-376.
- Ramakers, G. J. (2002). Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci*, 25(4), 191-199.
- Ramnani, N. (2006). The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci*, 7(7), 511-522.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1545-1564.
- Rice, D., og Barone, S., Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3, 511-533.
- Richter-Landsberg, C., Landreth, G. E., og Shooter, E. M. (1983). Microtubule proteins in PC12 pheochromocytoma cells. Isolation, composition and in vitro phosphorylation. *Dev Neurosci*, 6(1), 32-44.
- Rohn, T. T., Cusack, S. M., Kessinger, S. R., og Oxford, J. T. (2004). Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. *Exp Cell Res*, 295(1), 215-225.
- Rosenfeld, P., van Eekelen, J. A., Levine, S., og de Kloet, E. R. (1993). Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. *Cell Mol Neurobiol*, 13(4), 295-319.
- Rossi, D. J., og Slater, N. T. (1993). The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*, 32(11), 1239-1248.
- Sarnat, H. B., Nochlin, D., og Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev*, 20(2), 88-94.

- Selden, S. C., og Pollard, T. D. (1986). Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci*, 466, 803-812.
- Shafer, T. J., og Atchison, W. D. (1991). Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology*, 12(3), 473-492.
- Shinwell, E. S., Karplus, M., Reich, D., Weintraub, Z., Blazer, S., Bader, D., *et al.* (2000). Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 83(3), F177-181.
- Snell, L. D., Bhawe, S. V., Tabakoff, B., og Hoffman, P. L. (2001). Chronic ethanol exposure delays the 'developmental switch' of the NMDA receptor 2A and 2B subunits in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 78(2), 396-405.
- Sousa, R. J., Tannery, N. H., og Lafer, E. M. (1989). In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol Endocrinol*, 3(3), 481-494.
- Stoodley, C. J. (2011). The Cerebellum and Cognition: Evidence from Functional Imaging Studies. *Cerebellum*.
- Swanson, D. J., Tong, Y., og Goldowitz, D. (2005). Disruption of cerebellar granule cell development in the Pax6 mutant, Sey mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, 160(2), 176-193.
- Timmann, D., og Daum, I. (2007). Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research. *Cerebellum*, 6(3), 159-162.
- Tovey, E. R., Ford, S. A., og Baldo, B. A. (1987). Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. *J Biochem Biophys Methods*, 14(1), 1-17.
- Towbin, H., Staehelin, T., og Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Underwood, C. K., og Coulson, E. J. (2008). The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(9), 1664-1668.
- Urdiales, J. L., Becker, E., Andrieu, M., Thomas, A., Jullien, J., van Grunsven, L. A., *et al.* (1998). Cell cycle phase-specific surface expression of nerve growth factor receptors TrkA and p75(NTR). *J Neurosci*, 18(17), 6767-6775.
- Valentin, J. P., og Hammond, T. (2008). Safety and secondary pharmacology: successes, threats, challenges and opportunities. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 58(2), 77-87.

- van Eekelen, J. A., Bohn, M. C., og de Kloet, E. R. (1991). Postnatal ontogeny of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor gene expression in regions of the rat tel- and diencephalon. *Brain Res Dev Brain Res*, 61(1), 33-43.
- van Leeuwen, N., Kumsta, R., Entringer, S., de Kloet, E. R., Zitman, F. G., DeRijk, R. H., *et al.* (2010). Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*, 35(3), 339-349.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H., og Gonzalez, B. J. (2003). Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science*, 300(5625), 1532-1534.
- Wakefield, I. D., Pollard, C., Redfern, W. S., Hammond, T. G., og Valentin, J. P. (2002). The application of in vitro methods to safety pharmacology. *Fundam Clin Pharmacol*, 16(3), 209-218.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., og Mishina, M. (1993). Distinct spatio-temporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. *Ann N Y Acad Sci*, 707, 463-466.
- Westphal, D., Sytnyk, V., Schachner, M., og Leshchyns'ka, I. (2010). Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 285(53), 42046-42057.
- Weyer, A., og Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*, 73(3), 400-409.
- Yamasaki, T., Kawaji, K., Ono, K., Bito, H., Hirano, T., Osumi, N., *et al.* (2001). Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development*, 128(16), 3133-3144.
- Yan, X. X., Najbauer, J., Woo, C. C., Dashtipour, K., Ribak, C. E., og Leon, M. (2001). Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol*, 433(1), 4-22.
- Yeh, T. F., Lin, Y. J., Lin, H. C., Huang, C. C., Hsieh, W. S., Lin, C. H., *et al.* (2004). Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*, 350(13), 1304-1313.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., og Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J*, 9(11), 3545-3550.
- Zagon, I. S., McLaughlin, P. J., og Smith, S. (1977). Neural populations in the human cerebellum: estimations from isolated cell nuclei. *Brain Res*, 127(2), 279-282.
- Zhang, H. L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dictenberg, J. B., *et al.* (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex

increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*, 31(2), 261-275.

Zhou, J., og Cidlowski, J. A. (2005). The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 70(5-7), 407-417.

Zucker, R. M., D'Alisa, R. M., og Gershey, E. L. (1979). Characterization of a CV-1 cell cycle. III. Biophysical parameters. *Exp Cell Res*, 122(1), 1-8.